

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

E.A.P. DE ODONTOLOGÍA

**Efecto de la Bromelina en la Concentración Sérica y
Ósea de Clindamicina**

TESIS

Para obtener el título de Cirujano Dentista

AUTOR

Jesús Walberto Zela Moraya

Lima – Perú

2012

JURADO DE SUSTENTACIÓN

Presidente : Dr. C.D. Luis H. Gálvez Calla

Miembro : Mg. C.D. Manuel A. Mattos Vela

Miembro Asesor : Mg. C.D. Miguel O. Rodríguez Alfaro

“Sigue tus sueños. Escucha a tu corazón. Digan lo que digan, no olvides que sólo vives una vez y que tus sueños, grandes o pequeños, son el mayor tesoro que guiarán tu vida hacia un destino único y maravilloso”.

Dedicatoria

*A Dios, por regalarme el milagro de la
vida y ser mi maestro ante cualquier
circunstancia.*

*A mis queridos padres: Wester y Loyola,
por todo su amor, esfuerzo y apoyo en cada
momento de mi vida.*

*A mis queridos hermanos:
Edison, Paúl, Greta, Wilmer y Aurora,
por toda su comprensión y colaboración
en cada una de mis metas cumplidas.*

*A mis queridos sobrinos: Alisson,
Nicole, Astrid y Giacomo, que alegran
cada día de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

- Al **Vicerrectorado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos** y al **Instituto de Investigación Estomatológica** por financiar la ejecución de este proyecto de investigación.
- A mi asesor, **Mg. C.D. Miguel O. Rodríguez Alfaro**, docente de Farmacología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por sus conocimientos, por su apoyo y gran colaboración, pero sobre todo por su amistad; sin los cuales no se hubiera podido realizar este trabajo.
- Al **Mg. Q.F. Miguel Grande Ortiz**, Coordinador del Laboratorio de Bioequivalencia y Biodisponibilidad del Centro Nacional de Control de Calidad del Instituto Nacional de Salud (INS), por su desinteresada colaboración en brindar el Estándar de Clindamicina USP.
- A la **Tec. Med. Edith Lavado**, del Laboratorio de Microbiología del Centro Nacional de Control de Calidad del Instituto Nacional de Salud (INS), por su colaboración y orientación durante la ejecución del proyecto.
- Al personal del Laboratorio de Microbiología del Centro Nacional de Control de Calidad del Instituto Nacional de Salud (INS), por su colaboración y paciencia durante la ejecución del proyecto.
- A la **C.D. Katia Medina**, docente del Dpto. de Odontología Biosocial de la Facultad de Odontología de la UNMSM por su colaboración y apoyo en la elaboración de la parte metodológica y estadística.
- A cada uno de mis amigos, por andar juntos los años de estudios universitarios y estar siempre conmigo en los buenos y malos momentos.

ÍNDICE

Resumen	<i>i</i>
Summary	<i>ii</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Antecedentes	3
2.2 Bases teóricas	7
2.2.2 Generalidades	7
2.2.2 Bromelina	8
A. Composición química	13
B. Farmacocinética de la bromelina	15
C. Toxicidad, efectos secundarios e interacciones medicamentosas	16
D. Aplicaciones de la bromelina en Odontología	18
2.2.3 Clindamicina	20
A. Generalidades	20
B. Características farmacocinéticas	21
C. Concentración ósea de clindamicina	22
2.2.4 Terapia antibiótica en Odontología	23
2.3 Definición de términos	26
2.4 Planteamiento del problema	28
2.4.1 Área Problema	28
2.4.2 Delimitación del problema	29
2.4.3 Formulación del problema	30
2.5 Justificación	31
2.6 Objetivos de la investigación	32
2.6.1 Objetivo General	32
2.6.2 Objetivos Específicos	32
2.7 Hipótesis	33
2.8 Operacionalización de la variable	34

III. METODOLOGÍA	36
3.1 Tipo de estudio	36
3.2 Población y muestra	36
3.2.1 Unidad de análisis	37
3.3. Materiales y equipos	37
3.4 Métodos	40
3.4.1 Procedimientos y Técnicas	41
A. Administración de medicamentos	41
B. Procedimientos Quirúrgicos y obtención de muestras	42
C. Procedimiento microbiológico, método de potencia antibiótica (cilindro-placa)	44
3.4.2 Análisis y Procesamiento de datos	47
IV. RESULTADOS	49
V. DISCUSIÓN	65
VI. CONCLUSIONES	69
VII. RECOMENDACIONES	70
Referencias Bibliográficas	71
Anexos	78

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Diámetros de halos de inhibición de las soluciones estándar	49
CUADRO 2. Diámetros de los halos de inhibición de la solución estándar 3 (S3), en todas las placas de siembra.	50
CUADRO 3. Relación entre las concentraciones de clindamicina y las medias de halos de inhibición de las soluciones estándar.	51
CUADRO 4. Diámetros de halos de inhibición de las muestras de suero del grupo A (Clindamicina sola)	54
CUADRO 5. Concentración de clindamicina en las muestras de suero del grupo A (Clindamicina sola)	55
CUADRO 6. Diámetros de halos de inhibición de las muestras de suero del grupo B (clindamicina con bromelina)	56
CUADRO 7. Concentración de clindamicina en las muestras de suero del grupo B (clindamicina con bromelina)	57
CUADRO 8. Diámetros de halos de inhibición de las muestras óseas del grupo A (Clindamicina sola)	58
CUADRO 9. Concentración de clindamicina en las muestras óseas del grupo A (Clindamicina sola)	59
CUADRO 10. Diámetros de halos de inhibición de las muestras óseas del grupo B (clindamicina con bromelina)	60
CUADRO 11. Concentración de clindamicina en las muestras óseas del grupo B (clindamicina con bromelina)	61
CUADRO 12. Comparación de las concentraciones séricas de clindamicina entre el grupo A y grupo B.	12
CUADRO 13. Comparación de las concentraciones óseas de clindamicina entre el grupo A y grupo B.	63

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Esquema de distribución de las muestras en las placas Petri.	46
GRÁFICO 2. Curva de Regresión Lineal.	52
GRÁFICO 3. Medias de las concentraciones séricas y óseas de clindamicina de los grupos experimentales.	64

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1. CERTIFICADO SANITARIO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	78
ANEXO N° 2. CERTIFICADO DE LABORATORIO DEL MEDIO DE CULTIVO	79
ANEXO N° 3. PRUEBA DE TRASMITANCIA EN ESPECTROFOTÓMETRO	80
ANEXO N° 4. FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS	81
ANEXO N° 6. FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE POTENCIA ANTIBIÓTICA, EMPLEADO EN EL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	82
ANEXO N° 6. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN EN LAS INSTALACIONES DEL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA-UNMSM.	87
ANEXO N° 7. AGENTES FARMACOLÓGICOS	88
ANEXO N° 8. ADMINISTRACIÓN DE MEDICAMENTOS	89
ANEXO N° 9. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS	90
ANEXO N° 10. TOMA DE MUESTRA DE SANGRE	91
ANEXO N° 11. MUESTRA DE SANGRE EN TUBOS DE ENSAYO	92
ANEXO N°12. DISLOCACIÓN CERVICAL DE ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN	93
ANEXO N° 13. PREPARACIÓN DE MUESTRA DE TEJIDO ÓSEO	94
ANEXO N° 14. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	97
ANEXO N° 15. PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR	99

ANEXO N° 16. PREPARACIÓN DE LAS PLACAS	100
ANEXO N° 17. ENSAYO MICROBIOLÓGICO	101
ANEXO N° 18. HALÓMETRO	104
ANEXO N° 19. PLACAS DE SIEMBRA CON HALOS DE INHIBICIÓN	105

Resumen

Objetivo: El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la bromelina en la concentración sérica y ósea de clindamicina, después de su administración conjunta por vía oral. **Métodos:** Es un estudio cuasiexperimental, transversal y prospectivo. Se empleó una población de 36 ratas albinas, del Instituto Nacional de Salud (INS), divididos en tres grupos aleatoriamente, a los que se les administró 90 mg/kg de clindamicina (Grupo A, control positivo), 90 mg/Kg de clindamicina más 75mg/Kg de bromelina (Grupo B, experimental) y 1ml de 0,9%ClNa (Grupo C, control negativo). Se obtuvieron muestras de suero y tejido óseo, una hora después de la administración oral de los medicamentos, mediante punción intracardiaca y disección mandibular, respectivamente. Para medir la concentración de clindamicina, se empleó el método de potencia antibiótica, cilindro-placa. **Resultados:** Se obtuvo que la concentración media de clindamicina en suero fue de 1,91 µg/ml en el grupo A y 1,64 µg/ml en el grupo B, mientras que la concentración media de clindamicina en hueso fue de 0,09 µg/g en el grupo A y 0,39 µg/g en el grupo B, siendo estos resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$) para ambos tipos de muestras. En las muestras del grupo C, no se obtuvo ninguna concentración. **Conclusión:** Se concluye que la bromelina disminuye la concentración sérica de clindamicina y al mismo tiempo incrementa considerablemente la concentración ósea del antibiótico, después de su administración conjunta por vía oral, demostrando que la bromelina presenta una acción, aún no determinada, en el antibiótico.

Palabras claves: *Fitoterapéutico, Bromelina, Terapia antibiótica, Clindamicina, Concentración ósea.*

Summary

Objective: The objective of this research was to evaluate the effect of bromelain on serum and bone concentration of clindamycin after oral administration. **Methods:** It is a quasi-experimental, transversal and prospective research. We used a population of 36 albino rats of the National Institute of Health (INS), divided into three groups, which were oral dosing 90 mg/kg of clindamycin (Group A, positive control), 90 mg/kg of clindamycin more 75mg/kg of bromelain (Group B, experimental) and 1 ml 0.9% NaCl (Group C, negative control). It was obtained samples of serum and bone tissue one hour after oral doses of drugs by intracardiac puncture and mandibular dissection, respectively. To measure the concentration of clindamycin was used the antibiotic potency method, cylinder-plate. **Results:** The mean concentration of clindamycin in serum was 1.91 µg/ml in group A and 1.64 µg/ml in group B, while the average concentration of clindamycin in bone was 0.09 µg/g in group A and 0.39 µg/g in group B, these results being statistically significant ($P < 0.05$) for both types of samples. In samples of group C, did not obtain any concentration. **Conclusion:** We conclude that bromelain decreases serum concentrations of clindamycin and at the same time considerably increases the concentration of the antibiotic bone after its oral administration, demonstrating that bromelain has an action not yet determined on the antibiotic.

Keywords: *Phitoterapeutic, Bromelain, antibiotic therapy, clindamycin, bone concentration .*

I. INTRODUCCIÓN

Desde los albores de la humanidad y a través del tiempo, las plantas han sido siempre una fuente importante de recursos terapéuticos. Esto se debe a que las sustancias químicas que las componen, tienen una actividad biológica en los seres humanos, por lo que constituyen una alternativa de solución para los numerosos problemas que enfrentamos en el campo de la salud.

Hoy en día, no existe duda sobre la importancia de las plantas en la medicina; sin embargo, y a pesar del desarrollo alcanzado por la investigación científica, estas constituyen un arsenal de sustancias biológicamente activas aún por explorar. Por tal motivo, la aplicación de medicamentos derivados de las plantas o fitoterapéuticos, debe efectuarse sobre una base científica, pues la administración conjunta con “fármacos convencionales” puede producir variaciones en la magnitud de su efecto, interactuando mediante mecanismos farmacocinéticos o farmacodinámicos.

Dentro de los derivados procedentes de las plantas, encontramos ciertas enzimas proteolíticas con interesantes aplicaciones terapéuticas, entre las que figura la bromelina. Un compuesto aislado desde los órganos de la piña tropical (*Ananas comosus* L. Merr.), la cual ha sido empleada como planta medicinal por diversas culturas americanas. La bromelina, conocida químicamente desde finales del siglo XIX e introducida como recurso terapéutico desde 1957 por el Dr. Heinicke, no es una sustancia sola, sino una colección de enzimas que presentan diversas propiedades, las que han sido demostradas en estudios in

vitro e in vivo, tales como la actividad antiedematosa, antiinflamatoria, antitrombótica, antiagregante plaquetaria y fibrinolítica. Además, es empleada en los Estados Unidos y Europa, como auxiliar en la recuperación de cirugía y lesiones atléticas, así como para tratar la sinusitis y la flebitis.

Por otra parte, existen estudios que revelan el incremento de los niveles sanguíneos y tisulares de algunos antibióticos, como las penicilinas y tetraciclinas, administrados conjuntamente con bromelina por vía oral. Siendo esta propiedad empleada también en la odontología, ya que en todo momento nos enfrentamos a procesos infecciosos de la cavidad bucal, los cuales requieren la instauración de terapias con antimicrobianos de amplio espectro y con adecuados parámetros farmacocinéticos, es decir, buena absorción y difusión en el lugar de la infección.

Por tal motivo, en el presente estudio se investiga el efecto de la bromelina sobre la concentración sérica y ósea de clindamicina, administrados conjuntamente por vía oral en ratas; siendo éste un estudio pionero, debido a que es la primera vez en emplearse la bromelina como coadyuvante a la clindamicina, ejerciendo un efecto sinérgico sobre el antibiótico, ampliando la base científica de los conocimientos terapéuticos de la bromelina.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Neubauer (1961) evaluó la combinación de bromelina con una terapia antibiótica, en pacientes hospitalizados por neumonía, bronquitis, infección cutánea por staphylococcus, tromboflebitis, pielonefritis y abscesos rectales. A un grupo de veintitrés pacientes, tratados sin éxito con terapia antibiótica, se les administró bromelina cuatro veces al día junto con los siguientes antibióticos, penicilina, cloranfenicol, eritromicina o novobiocina, ya sea solos o en combinación, siendo veintidós pacientes los que respondieron favorablemente al tratamiento combinado. Así mismo, emplearon un grupo control de 56 pacientes tratados solamente con antibióticos, observando una reducción significativa de la morbilidad en cada estado de la enfermedad, con el uso combinado de bromelina más antibiótico en contraposición a los tratamientos sólo con antibióticos.¹

Ryan (1967) realizó un estudio clínico doble ciego, en 48 pacientes de edades comprendidas entre 9 a 70 años y con diagnóstico de sinusitis aguda de moderada a severa, tratados con una terapia estándar que incluía antihistamínicos, analgésicos y antibióticos. Veintitrés de los pacientes recibieron bromelina cuatro veces al día, mientras que los veinticinco restantes recibieron un placebo. Los resultados mostraron que existen diferencias significativas en la resolución de la inflamación de la mucosa nasal, entre el grupo que recibió la terapia estándar junto con bromelina a

comparación del grupo placebo. Por otro lado, entre los pacientes que recibieron antibióticos con bromelina o placebo, no se apreciaron diferencias significativas; sin embargo, observando más detalladamente los resultados, se debe considerar la posibilidad de que los antibióticos junto con la bromelina pueden ayudar a disminuir la mucositis nasal.²

Renzinni y Varengo (1972) realizaron un estudio cruzado en un grupo de pacientes geriátricos, con la finalidad de aumentar la absorción de tetraciclina, administrándola conjuntamente con bromelina por vía oral. Para hallar el nivel de absorción, determinaron las concentraciones de tetraciclina en plasma y orina, por medio de un método microbiológico. Encontrando una gran diferencia interindividual, de los niveles plasmáticos de tetraciclina después de una dosis única; sin embargo, apreciaron que por cada paciente, la bromelina aumentaba los niveles de tetraciclina en plasma y orina.³

Luerti y Vignali (1978) estudiaron la influencia de la bromelina en la permeabilidad tisular de los antibióticos en el útero, las trompas de Falopio y en los ovarios. Para lo cual, emplearon a 18 mujeres bajo tratamiento con amoxicilina o tetraciclina, administrados simultáneamente con 80 mg de bromelina. Los resultados mostraron un incremento de las concentraciones de ambos antibióticos, a nivel sérico y tisular de los diferentes órganos, en comparación con los controles. Así mismo, se apreció que este efecto no fue generado por la indometacina, un medicamento antiinflamatorio que actúa como un inhibidor de la ciclooxigenasa, concluyendo que la bromelina tiene

cierta actividad indeterminada que mejora la absorción y distribución tisular de los antibióticos.⁴

Tinozzi y Venegoni (1978) en un ensayo doble ciego controlado con placebo, seleccionaron aleatoriamente a 42 pacientes destinados para diversos procedimientos quirúrgicos, a los que se les administró 1,000 mg de amoxicilina conjuntamente con 160 mg de bromelina o un placebo, encontrando que la bromelina incrementó de manera significativa el nivel tisular de la amoxicilina en la vesícula biliar, bilis y piel, en comparación al placebo.⁵

Bradbrook y cols. (1978) realizaron un ensayo clínico, con el objetivo de determinar el efecto de la bromelina en la absorción de tetraciclina, administrada por vía oral. Para tal motivo, emplearon 10 voluntarios sanos, cinco mujeres y cinco hombres, de edades entre 23-31 años, a los que se les administró en un primer momento 500 mg de tetraciclina o 500 mg de tetraciclina más 80 mg de bromelina, para después de 7 días suministrar el segundo tratamiento. Las concentraciones de tetraciclina se determinaron mediante un método espectrofluorométrico, con un nivel de sensibilidad de 0,15 µg/ml a 5 µg/ml. Determinaron que los cambios en las concentraciones individuales de la tetraciclina, no muestran variaciones significativas, sugiriendo que la bromelina no hace alguna diferencia importante en la absorción o eliminación de la tetraciclina cuando se administra en una dosis de 80 mg.⁶

Sanders (1990) realizó un estudio aleatorizado en 36 pacientes con infecciones por clamidia, con la finalidad de investigar la eficacia de un tratamiento a base de 250 mg de clorhidrato de tetraciclina más 40 mg de bromelina, cuatro veces al día, en comparación a un tratamiento sólo con 100 mg de doxiciclina, dos veces al día, ambos tratamientos durante un período de 14 días. Después de una semana, observó que la infección fue eliminada en el 66,7% de los pacientes tratados con tetraciclina más bromelina y en el 55,6% de los pacientes tratados con doxiciclina. La efectividad clínica de las dos terapias se consideró buena o muy buena en todos los casos; sin embargo, los pacientes tratados con tetraciclina más bromelina, presentaron menos efectos adversos en comparación de aquellos tratados sólo con doxiciclina.⁷

Shahid y cols. (2002) con el objetivo de determinar la eficacia y la seguridad de una presentación oral de enzimas, Phlogenzym (MUCOS Pharma GmbH, Geretsried, Alemania; constituido por 90 mg de bromelina, 48 mg de tripsina y 100 mg de rutina), como terapia coadyuvante en el tratamiento de la sepsis en niños. Desarrollaron un estudio controlado en 60 pacientes con sepsis, de 1 mes de nacido hasta 12 años de edad, hospitalizados en un centro de salud de tercer nivel de Mumbai (India). Los pacientes recibieron aleatoriamente placebo (n=30) o Phlogenzym (n= 30), una tableta por 10 kg de peso, hasta un máximo de seis tabletas al día, divididas en dos o tres dosis, durante 14 a 21 días, junto con los antibióticos y el tratamiento de soporte adecuado. Los resultados mostraron que los pacientes presentaban una mejor evolución al tratamiento de la sepsis cuando fue administrado el

Phlogenzym, remitiendo la fiebre, el apoyo hemodinámico, normalizando la escala de Glasgow e iniciando la alimentación oral en menos días, en comparación al grupo placebo. Llegando a la conclusión, que el Phlogenzym es eficaz como coadyuvante a los antibióticos y al tratamiento de apoyo, para una recuperación más rápida de los pacientes pediátricos con sepsis.⁸

2.2. Bases teóricas

2.2.1 Generalidades

La historia del hombre está estrechamente ligada con el uso de las plantas, debido a que son fuente importante de compuestos con diversas aplicaciones, fundamentalmente alimentarias y terapéuticas, recurriendo hasta hoy para el tratamiento de sus enfermedades. Por tal motivo, en 1977 la OMS llamó a introducir recursos medicinales tradicionales en los sistemas de salud, mediante métodos adecuados que garanticen los principios de seguridad, eficacia y calidad.⁹

Es así, que la piña, una especie originaria de la América Tropical y utilizada por los nativos para la corrección de trastornos estomacales, entre otros beneficios; viene siendo estudiada ampliamente por la Medicina, debido a los beneficios terapéuticos que presentan algunos de sus componentes. Dependiendo de la región donde se encuentra, recibe diferentes nombres, siendo los más comunes el de abacaxi, naná, ananás, piña tropical y piña de

azúcar; sin embargo, su nombre científico es *Ananas comosus* (L.) Merr. o su sinónimo *Ananas sativus*, perteneciente a la familia Bromeliaceae.¹⁰

En nuestro país, existen regiones climáticas cálidas y templadas que permiten el desarrollo de la piña y aunque actualmente su producción no es significativa, es uno de los productos agrícolas que crece cada año, debido a su demanda externa, existiendo más de 11000 has sembradas con un rendimiento promedio de 14200 kg/ha, siendo la selva de Junín de donde se obtiene el 47% de la producción nacional, representado por los valles de Chanchamayo y Satipo, por lo que es uno de los cultivos de mayor potencial para esta zona. La variedad más sembrada en la zona de Chanchamayo es la Samba y en menor escala otras variedades como la Cayena lisa”.¹¹

2.2.2 Bromelina

La bromelina es un conjunto de enzimas proteolíticas, perteneciente al grupo de proteasas de cisteína, proteasas sulfhidríticas o tiolproteasas, aislada y purificada de los órganos de plantas de la familia Bromeliaceae. Se la conoce químicamente desde 1876, aunque habrían de transcurrir varias décadas antes de que se empezara a utilizar con fines terapéuticos. En 1957 el Dr. Ralph Heinicke, bioquímico de la Universidad de Minnesota e investigador pionero en materia de enzimas de las plantas y frutas, encuentra a la bromelina en altas concentraciones en el tallo de la piña. Es a partir de este momento, que se introduce como un compuesto terapéutico, investigado para el tratamiento de diferentes enfermedades.¹²

En un inicio, se conocía como bromelina a la enzima extraída y purificada del tallo de la piña (*Ananas comosus* L. Merr), detectándose más adelante en los frutos inmaduros y en otras especies de la familia Bromeliaceae. Debido a ello, se denominó a la primera bromelina del tallo (stem bromelain) y a la segunda bromelina de la fruta (fruit bromelain). Por ello, la enzima sólo quedaría bien definida mencionando el órgano del cual es extraída, la especie y la variedad de la fruta. Así el nombre completo de la bromelina del tallo (stem bromelain) sería en realidad bromelina del tallo de *Ananas comosus* (L) Merr. Var. Cayena Lisa¹³. Actualmente, la bromelina se puede obtener de las diferentes partes de la piña como las hojas, tallos, pulpa y cáscaras de los residuos industriales de la fruta¹⁴.

Esta enzima es muy interesante, debido a sus aplicaciones en diversas industrias y además, no es reemplazable por enzimas procedentes de microorganismos (proteasa neutra, alfa amilasa) y otras proteasas de origen animal (tripsina, pepsina), debido a su alta actividad y especificidad para algunas reacciones químicas. Así mismo, presenta la ventaja de encontrarse en altas concentraciones en el estadio de maduración de la piña, en comparación a las enzimas obtenidas de otras frutas, como la papaína y la ficina.¹³⁻¹⁵

En la industria alimentaria, la bromelina es empleada para el ablandamiento de la carne roja, en la producción de panes y galletas, en la preparación de leche de soya y durante la fermentación en la fabricación de cerveza. En el laboratorio se usa en la fabricación de peptonas, que formarán parte de

medios de cultivo, en la producción de aminoácidos y péptidos, y en el estudio de la composición de las proteínas¹³. Por otro lado, en la industria farmacéutica, ha sido empleada en gran parte de los Estados Unidos y Europa, como medicamento alternativo o complementario a los glucocorticoides, antirreumáticos no esteroideos y agentes inmunomoduladores, siendo administrada por vía oral en combinación con otras enzimas proteolíticas (papaína, tripsina, quimiotripsina, entre otras)^{12,16,17}; sin embargo, actualmente existe un renovado interés por esta enzima, desde que fue descrita su actividad antitumoral y antimetastizante frente a algunos tumores¹⁸.

Las aplicaciones terapéuticas de la bromelina han sido demostradas en estudios “*in Vitro*” e “*in vivo*”, siendo empleada como una droga sinérgica para potenciar la acción de los antibióticos, como antiinflamatorio y antiedematoso en los procesos post-operatorios, como mucolítico para ayudar a la descongestión de las vías respiratorias, como enzima digestiva proteolítica en el tratamiento de las dispepsias, como antiagregante plaquetario en la prevención de los síntomas de la angina de pecho y además, por su baja toxicidad la convierte en herramienta adecuada para el control de enfermedades inflamatorias crónicas. Según estudios recientes, esta enzima induce la diferenciación de células tumorales y atenúa el crecimiento del tumor en tratamientos contra el cáncer¹²⁻¹⁹. Todas estas propiedades, hacen de la bromelina un agente fitoterapéutico muy interesante, convirtiéndose actualmente, en una de las cisteín-proteasas más investigadas para profundizar en sus bondades terapéuticas.

Es así que, Borrelli y cols. (2011)²⁰, realizaron un estudio *in vitro* e *in vivo*, para investigar el efecto de la bromelina sobre la motilidad y tránsito intestinal en ratones. *In vitro*, observaron que la bromelina inhibe las contracciones inducidas por diferentes compuestos espasmógenos en el íleon del ratón, con una potencia similar; mientras que *in vivo*, apreciaron que la bromelina inhibe la motilidad intestinal preferentemente en estados fisiopatológicos, como la diabetes. Por lo tanto, esta enzima podría ser un componente principal para el desarrollo de nuevos fármacos, capaces de normalizar la motilidad intestinal en la inflamación y la diabetes.

Fitzhugh y cols. (2008)²¹, con la finalidad de explicar los posibles mecanismos antiinflamatorios de la bromelina, realizaron algunos estudios para verificar si la bromelina produce cierta eliminación proteolítica específica de las moléculas CD128 ubicadas en la superficie celular de los neutrófilos, lo que disminuye su migración a los sitios de inflamación. Sus resultados, en el tratamiento *in vivo* con bromelina, mostraron que se genera una reducción del 50 al 85% de la migración de neutrófilos, en la cavidad peritoneal inflamada, concluyendo, que la bromelina puede disminuir efectivamente la migración de neutrófilos a los sitios de inflamación aguda y apoyan la hipótesis en la eliminación de ciertos receptores específicos CD128, como potencial mecanismo de acción. Así mismo, Onken y cols. (2008)²², en un estudio *in vitro*, midieron la secreción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, en tejidos obtenidos de biopsias endoscópicas de pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria, como la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn. Demostraron que la bromelina *in vitro* disminuye

la secreción de G-CSF, del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), IFN- γ , CCL4/proteína inhibidora del macrófago (MIP)-1 β y TNF, en el tejido inflamado; proponiendo a la bromelina como una nueva terapia para la enfermedad intestinal inflamatoria.

La bromelina también ha sido evaluada como tratamiento alternativo para diferentes enfermedades, como lo demuestran, en un estudio clínico para evaluar la eficacia de la bromelina, Risulo y cols. (2007)²³, en pacientes con Pitiriasis Liquenoide Crónica, que no respondían al tratamiento convencional (antibióticos orales, corticoides y/o fototerapia); siendo sometidos a una terapia de tres meses solamente con bromelina por vía oral (40 mg tres veces al día durante 1 mes, 40 mg dos veces al día durante 1 mes y 40 mg al día durante 1 mes). Obteniendo una recuperación clínica completa de todos los pacientes después del tratamiento, sin presentar efectos secundarios al tratamiento; sin embargo, en 12 meses de seguimiento, dos pacientes experimentaron una recaída, 5 a 6 meses después de la suspensión de la terapia, respondiendo favorablemente a otro breve ciclo de terapia. De esta manera, concluyen que la bromelina puede considerarse una opción terapéutica eficaz para el tratamiento de la Pitiriasis, siendo esta eficacia, relacionada a su acción antiinflamatoria, inmunomoduladora y/o a su propiedad antiviral.

Por otra parte, la bromelina también ha sido empleada, desde hace muchos años atrás, en el tratamiento de la sinusitis aguda y crónica; como lo refieren Ryan (1967)² y más recientemente Braun y cols. (2005)²⁴, en un estudio

clínico, realizado para medir la eficacia y seguridad de la bromelina en niños con diagnóstico de sinusitis aguda; los cuales fueron divididos en grupos y tratados sólo con bromelina por vía oral, con una terapia estándar para sinusitis y una combinación de ambos, logrando apreciar que los pacientes tratados con bromelina, presentaban la remisión de los síntomas en menos días en relación con el tratamiento estándar y la combinación de ambos, concluyendo que el uso de enzimas proteolíticas puede presentar un gran beneficio en el tratamiento de esta enfermedad.

A. Composición química

El principal componente de la bromelina es una fracción proteolítica con un grupo sulfidrilo. Constituida por una mezcla compleja de diferentes tior- endopeptidasas y otros componentes aún no caracterizados por completo, tales como fosfatasas, glucosidasas, peroxidasas, celulasas, glicoproteínas y carbohidratos, entre otros. Además, la bromelina contiene varios inhibidores de proteinasas.^{25, 26}

Dependiendo de su origen (tallo o la fruta de la piña), la bromelina va a presentar diferentes características, distinguiéndose incluso por su actividad proteolítica. La bromelina de la fruta (EC 3.4.22.33), es una cisteín-proteasa de carácter ácido, similar a la papaína, extraída de la inflorescencia de la piña, donde la secuencia de aminoácidos en torno a su sitio activo es: Asn-Glx-Asn-Pro-Cys-Ala-Cys. Esta enzima actúa sobre la caseína, la hemoglobina y la gelatina¹³. Por otro lado, la bromelina del tallo (EC

3.4.22.32), es una proteasa de carácter básico, con un contenido de carbohidratos de 1.46% y con menor actividad sobre la caseína. Es la cisteína endopeptidasa más abundante en el tallo de la piña. Presenta una amplia especificidad de corte de la proteína, que tiene una marcada preferencia por la Z-Arg-Arg-|-NHMeC entre los sustratos de moléculas pequeñas.²⁷

Según algunos autores, la secuencia de aminoácidos en la bromelina del tallo va desde 212 a 315 aminoácidos y con un peso molecular desde aproximadamente 23 kDa a 35 o 37 kDa respectivamente. Para la secuencia de 212 aminoácidos, su sitio activo está en los aminoácidos 26 y 158 presentando tres puentes disulfuro y una secuencia de carbohidratos ligados al aminoácido 117; y en la secuencia de 315, su sitio activo está en los aminoácidos 147 y 279, también con tres enlaces disulfuro pero sin secuencia de carbohidratos.²⁷

Hernandez y cols. (2003)¹⁸ obtuvieron un extracto crudo aislado de la bromelina del tallo, muy activo y estable, con una fracción proteolítica mayoritaria de masa molar de 24 500 Da, pH óptimo cercano a 7 frente a hemoglobina y buena estabilidad en un rango de pH de 3 a 9 y temperaturas de hasta 50°C. El preparado semipurificado por cromatografía de intercambio iónico en carboximetil celulosa-52 es 2,34 veces más activo que el extracto original. Tiene pH óptimo de 6,8 y una estabilidad en función del pH y la temperatura inferior a la del preparado crudo. Si se conserva liofilizado a -20 °C mantiene el 80% de la actividad durante un año.

Las preparaciones comerciales de la bromelina son evaluadas de acuerdo a su actividad proteolítica. Cuando la fracción proteolítica de la bromelina se purifica y se extrae, el resultado es una potente enzima proteolítica in vitro; sin embargo, este componente ha demostrado ser fisiológicamente inactivo in vivo para algunas de las condiciones en las que la bromelina tiene un efecto beneficioso¹⁶. Es así que, la inhibición de la agregación plaquetaria y la acción antiinflamatoria parecen estar relacionadas con la actividad de la proteasa, mientras otros efectos tales como la inhibición del crecimiento tumoral y la metástasis de células, así como el desbridamiento de las quemaduras se asocian a otros componentes no proteolíticos que figuran en la bromelina. Por lo tanto, la determinación de la actividad proteolítica no es suficiente para caracterizar completamente las propiedades farmacológicas de la bromelina.¹⁷

B. Farmacocinética de la bromelina

El epitelio intestinal humano adulto ha sido tradicionalmente descrito como impermeable a las proteínas. Sin embargo, la evidencia directa e indirecta sugiere que, en condiciones fisiológicas, la bromelina no es inactivada completamente, existiendo cierta absorción en el tracto gastrointestinal de las proteínas no degradadas. Así lo demuestran algunas investigaciones, donde la bromelina administrada por vía oral a conejos, aumenta los niveles séricos de plasmina en los animales y prolonga el tiempo de protrombina y antitrombina¹⁷. Por su parte, White y cols. (1988)²⁸ estudiaron la absorción intestinal de la ¹²⁵I-bromelina en ratas, después de su administración por vía

oral, detectando hasta un 40% de la enzima intacta en el plasma, con una concentración máxima de 270 ng/ml, una hora después de la administración; sin embargo, su actividad proteolítica es rápidamente desactivada, probablemente por los controles normales de la proteasa y la α_2 -macroglobulina plasmática. En otro estudio realizado por Castell y cols. (1997)²⁹, se investigó la permeabilidad intestinal de la bromelina en hombres sanos, después de su administración oral, siendo detectada en el plasma por inmunoensayo y por su actividad proteolítica. Determinaron el tiempo de vida media plasmática de 6 a 9 h y después de la multidosis oral (3g/día), la concentración plasmática alcanza hasta 5 ng/ml a las 48 h. Así mismo, hallaron la presencia de la proteína no degradada en el plasma, asociada con la α_2 -macroglobulina y la α_1 -antiquimiotripsina. Los resultados de este trabajo confirman la existencia de un transporte intestinal pequeño pero significativo de las proteínas no degradadas en hombres sanos, manteniendo su actividad biológica, por lo menos en parte.

C. Toxicidad, efectos secundarios e interacciones medicamentosas

En general, las enzimas poseen un bajo nivel de toxicidad, aunque algunas proteasas muestran ser irritantes para la piel y los ojos, sobre todo en altas concentraciones o en contacto prolongado. La preocupación principal de la seguridad asociada a las enzimas es la inducción de alergias respiratorias en los trabajadores en el lugar de fabricación, donde la exposición repetida a una proteína extraña puede inducir sensibilidad^{19, 30}.

Diversos estudios experimentales tanto en humanos como en animales, reportan que la bromelina es sustancia terapéutica no tóxica. En estudios sobre ratas, no se observaron efectos tóxicos con dosis orales tan altas como 10 g/kg; así mismo, las pruebas de toxicidad en perros, con niveles crecientes hasta de 750 mg/kg de bromelina, administrados diariamente, no mostraron efectos tóxicos después de seis meses. Las dosis de 1,5 g/kg/día, administrada a ratas no mostraron efectos cancerígenos o teratogénicos¹⁶,¹⁷. Por otra parte, Hernández y cols. (2003)¹³ obtuvieron la DL₅₀ de un preparado semipurificado de bromelina a dosis única de 216,35 mg/kg y a dosis repetida de 105,91 mg/kg.

En ensayos clínicos humanos, los efectos secundarios por lo general no se observan; sin embargo, existen reportes que indican ciertos efectos adversos reseñados en cuanto al uso de dosis diarias de bromelina, tales como náuseas, vómitos, diarreas, algunos problemas menstruales y taquicardia, por lo que se recomienda precaución si se administra bromelina a las personas con hipertensión.^{16, 17}

El suministro de medicamentos a base de plantas es una forma de terapia popular en todo el mundo, existiendo actualmente un aumento progresivo en su utilización; sin embargo, la mayoría de estos no han sido investigados completamente en cuanto a la interacción con otras hierbas, suplementos, drogas o alimentos³¹. Es así que, Hidaka y cols. (2008)³², determinaron el efecto *in vitro* de algunos jugos de frutas en la actividad del citocromo P450 humano CYP2C9. Dentro de ellas, el jugo de piña mostró una potente

inhibición de la actividad del CYP2C9, así mismo también se determinó que la bromelina inhibía la actividad del citocromo mencionado, sugiriendo que el efecto inhibidor de la piña es debido a la bromelina. Por lo que, la bromelina podría alterar la biotransformación de todos los fármacos metabolizados por el CYP2C9, resultando en un aumento de la actividad farmacológica de los medicamentos cuyo metabolismo es inhibido.

Por otra parte, la bromelina podría aumentar el riesgo de sangrado o potenciar los efectos de la terapia con warfarina³³. A pesar, de no existir reportes hasta la fecha con respecto al uso simultáneo de la bromelina con agentes anticoagulantes o antiplaquetarios, se la debería utilizar tomando ciertas precauciones.

D. Aplicaciones de la bromelina en Odontología

Desde que la bromelina fue empleada para el tratamiento farmacológico, se han realizado pocos estudios en el campo de la Odontología, por lo general aprovechando sus propiedades antiinflamatorias y antiedematosas. De este modo, Inchingolo y cols. (2010)³⁴, realizaron un estudio clínico para evaluar la eficacia de la bromelina en el control del edema y el dolor postoperatorio, tras la exodoncia de una tercera molar inferior. A un total de 46 pacientes, se les realizó en un primer periodo, la exodoncia de la pieza dentaria 3.8, bajo el tratamiento postoperatorio de cefazolina (1 g/ 12 h/ IM), más bromelina (40 mg / 6 h / VO), durante 6 días; y en un segundo periodo, 60 días después, se les realizó la exodoncia de la pieza dentaria 4.8, con un tratamiento

postoperatorio de cefazolina (1 g/ 12 h/ IM) más ketoprofeno (100 mg/ 12 h / VO), a lo largo de 6 días. Los resultados mostraron que el grupo bromelina no fue estadísticamente diferente al grupo ketoprofeno, es decir, se apreció una reducción similar del dolor postoperatorio y del edema, como consecuencia de la administración de ambos medicamentos. Con esto, lo que demostraron claramente fue la eficacia de la bromelina en el tratamiento del edema postoperatorio en cirugías del tercer molar.

Por otra parte, Navrátil y cols. (2003)³⁵ demuestran la ventaja del uso combinado del láser terapéutico y un producto enzimático, constituido por 90 mg de bromelina, 48 mg de tripsina y 100 mg de rutina (Phlogenzym-MUCOS Pharma GmbH, Geretsried, Alemania), en el tratamiento postoperatorio de ciertas intervenciones quirúrgicas estomatológicas. El estudio demostró una reducción del tiempo de edema, un período más corto de cicatrización y un efecto analgésico considerable, después de las intervenciones quirúrgicas, en un nivel estadísticamente muy significativo, en comparación al empleo individual de cada tratamiento, por lo que este enfoque puede ser recomendado para lograr un resultado favorable después de algunas intervenciones quirúrgicas.

Asimismo, Aráuz (1982)³⁶ investigó el efecto de algunos anti-inflamatorios de origen vegetal (bromelina, escina y papaína) en la actividad reparadora del hueso mandibular de ratones, sometidos a una intervención quirúrgica. Todos los medicamentos fueron administrados intraperitonealmente en dosis semejantes a las indicadas para humanos, diariamente durante 15 días. Se

pudo observar que los animales tratados con bromelina y escina, presentaron una recuperación más rápida que los tratados con papaína y los del grupo control. No se apreciaron alteraciones provocadas por los anti-inflamatorios que indicaran un retraso en la regeneración ósea, muy por lo contrario, se constató una aceleración del proceso de cicatrización.

2.2.3 Clindamicina

A. Generalidades

La clindamicina perteneciente al grupo de las lincosamidas, es el derivado 7-cloro-7-desoxi de la lincomicina producida por el *Streptomyces lincolnensis*, caracterizándose por poseer mayor actividad antibacteriana y mejor absorción en el tracto gastrointestinal, por lo que se emplea con mayor frecuencia que la lincomicina. Se liga exclusivamente a la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos, en los mismos receptores que la eritromicina y el cloranfenicol, suprimiendo la síntesis proteínica. Además, se ha demostrado en algunas especies bacterianas, como el *Bacteroides fragilis*, que la clindamicina favorece la fagocitosis.^{37, 38}

La clindamicina es un antibiótico de amplio espectro, utilizado satisfactoriamente en todo el mundo durante más de 30 años, con actividad contra los aerobios grampositivos y una extensa gama de bacterias anaerobias, entre ellas los patógenos productores de betalactamasas. Los estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que este fármaco alcanza una

concentración elevada en el punto de infección, reduciendo la virulencia de las bacterias y reforzando las actividades fagocíticas de los linfocitos inmunitarios del huésped.³²

B. Características farmacocinéticas

La clindamicina se absorbe casi por completo después de la administración por vía oral y la presencia de alimentos en el estómago no modifica significativamente su absorción. Alcanza una concentración plasmática máxima de 2 a 3 µg/ml, 1 hora después de una dosis de 150 mg por vía oral³⁹. El palmitato de clindamicina, un preparado oral para niños, es un profármaco inactivo que se absorbe en forma de éster y enseguida es hidrolizado a clindamicina, que es la forma biológicamente activa en el suero³⁸. Para la administración parenteral se emplea el fosfato de clindamicina, que por vía IM alcanza una concentración máxima de 4-5 µg/ml a las 2 horas, con una dosis de 300 mg. Cuando se administraron 600 mg de clindamicina, por vía intravenosa cada 8 horas, se produjeron concentraciones de 5 a 15 µg/ml³⁷. La vida media del antibiótico es de casi 2.5 a 2.9 horas en adultos sanos y en casos de anuria puede prolongarse hasta 6 horas, aunque si la función hepática es normal, no es necesario modificar la dosificación. No se elimina por hemodiálisis o diálisis peritoneal.

La distribución es buena, alcanzando concentraciones altas en hueso y líquido sinovial, pleural y peritoneal. Llega muy mal al SNC, pero atraviesa la barrera placentaria. La unión a proteínas plasmáticas es del 60-95% y se

elimina fundamentalmente por vía biliar, alcanzando en bilis niveles muy altos, si no existe obstrucción, la eliminación urinaria es muy escasa, de 6 a 10%). Tras un estudio in vitro en microsomas del hígado e intestino humano, se demostró que este fármaco se metaboliza a través del CYP3A4 y CYP3A5 formando dos metabolitos, el sulfóxido de clindamicina y la clindamicina N-desmetil⁴⁰.

C. Concentración ósea de clindamicina

El manejo farmacológico de las infecciones óseas es complicado, dado que la terapia sistémica con antibióticos por sí sola no suele erradicar a las bacterias, debido a la escasa penetración en el hueso. Por otro lado, los efectos adversos se incrementan cuando se administran dosis altas de antibióticos, durante largos periodos de tiempo de tratamiento. Es así que desde hace mucho tiempo, se realizan diferentes investigaciones para comprobar el nivel de penetración ósea de los diversos antibióticos.

Nicholas y cols. (1975)⁴¹ realizaron un estudio para medir la concentración de clindamicina en treinta pacientes sometidos a reemplazo total de cadera, quienes recibieron 300 mg de fosfato de clindamicina por vía intramuscular, a partir del día anterior a la cirugía. Encontraron que la concentración media del antibiótico, en las muestras obtenidas durante la cirugía, fueron de 7.33 ± 3.37 µg/ml en el suero y $1,76 \pm 2.63$, µg/g en el hueso, siendo estos niveles mayores a los reportados hasta ese entonces, en comparación con otros antibióticos como la lincomicina y oxacilina. Así mismo, Summersgill y cols.

(1982)⁴² compararon las concentraciones óseas del metronidazol, clindamicina, cloranfenicol, cefoxitina, ticarcilina y moxalactam. Las muestras fueron obtenidas después de 0,5 h de la administración intravenosa de los medicamentos y se midieron microbiológicamente. Se encontró que la clindamicina alcanzó niveles óseos de hasta 8,1 µg/g, siendo mayor a los demás antibióticos. Por su parte, O'Reilly T y cols. (1992)⁴³, realizaron otro estudio para establecer la relación entre la concentración de antibiótico en el hueso y la eficacia del tratamiento de la osteomielitis estafilocócica en ratas, comparando la azitromicina con clindamicina y rifampicina. Siendo La osteomielitis una infección difícil de tratar, se apreció que la clindamicina junto con la rifampicina, presentaban mejores efectos en comparación de la azitromicina, a pesar que esta presentaba los mayores niveles en hueso.

2.2.4 Terapia antibiótica en Odontología

La naturaleza polimicrobiana de las infecciones odontogénicas, que pueden incluir bacterias aerobias y anaerobias, así como la heterogeneidad de los cuadros clínicos asociados, son consecuencia de la diversidad de la microbiota bucal y de la complejidad anatómica y funcional de la cavidad oral. Así mismo, estos procesos pueden dar lugar a múltiples complicaciones que pueden limitarse a afecciones locales o derivar hasta compromisos sistémicos. Por otro lado, se ha podido apreciar durante los últimos años, el aumento de la prevalencia de resistencias bacterianas y la proliferación de cepas productoras de betalactamasas.

Las infecciones de la cavidad bucal son un problema de salud pública frecuente y motivo constante de prescripción antibiótica, estimándose que en España las infecciones odontogénicas representan en torno al 10% de las prescripciones antibióticas⁴⁴. Por otro lado, un estudio realizado en Argentina por Gualda y cols. (2010)⁴⁵ sobre la prescripción de antimicrobianos, muestra que la mayor proporción de antibióticos prescritos fueron realizadas por tres especialidades médicas: clínica médica (37,84%), odontología (30,81%) y pediatría (25,95%). Bascones y cols. (2004)⁴³ establecen un consenso sobre el tratamiento antimicrobiano de las infecciones odontogénicas, donde proponen que la Amoxicilina más ácido clavulánico a dosis altas (2000mg/ 125mg) muestran buenos resultados y capacidad para superar resistencias bacterianas. Otros agentes como metronidazol y clindamicina, seguidos de claritromicina y azitromicina, han demostrado también ser activos frente a la mayoría de los microorganismos responsables de las infecciones odontogénicas.

Los miembros del grupo de la penicilina, principalmente fenoximetilpenicilina y amoxicilina, tradicionalmente se han considerado los antimicrobianos de elección en el tratamiento de las infecciones dentales agudas, mientras que la eritromicina se ha utilizado tradicionalmente como fármaco alternativo para los pacientes con hipersensibilidad a las penicilinas. Sin embargo, actualmente la clindamicina se viene utilizando con mayor frecuencia, sobre todo en aquellos casos complejos donde los procesos infecciosos se localizan en el tejido óseo y los microorganismos son más resistentes; así mismo se usa como antibiótico de elección en los pacientes alérgicos a

betalactámicos en la mayoría de las infecciones odontogénicas^{44, 46} y en las profilaxis antibióticas para prevenir endocarditis secundaria a intervenciones quirúrgicas, como lo recomienda la Asociación Americana del Corazón (AHA)⁴⁷, mostrando una excelente eficacia y seguridad.

Los estudios *in vitro* e *in vivo*, han demostrado que la clindamicina alcanza una concentración elevada en el punto de infección, reduce la virulencia de las bacterias y refuerza las actividades fagocíticas de los linfocitos inmunitarios del huésped. Como ya se mencionó, la clindamicina por vía oral se absorbe con rapidez y eficacia, y su concentración permanece por encima de la concentración inhibitoria mínima de la mayoría de los organismos por lo menos durante 6 horas^{48, 49}.

Numerosos ensayos clínicos y una extensa experiencia de farmacovigilancia tras la comercialización de clindamicina avalan su uso como fármaco efectivo en el tratamiento de infecciones orales maxilofaciales. Así lo demuestran Zetner y cols. (2003)⁵⁰ en un estudio donde midieron la concentración ósea de clindamicina, en los huesos mandibulares de perros y gatos, que presentaban algunas patologías bucales. Hallaron una concentración media de clindamicina de 8,18 µg/g en los perros (rango = 3,16 a 24,08 µg/g) y 17,43 µg/g en los gatos (rango = 2,45 a 51,60 µg/g). Sugiriendo que la concentración de clindamicina en las mandíbulas de los animales, pueden ser útiles para combatir infecciones después de los procedimientos quirúrgicos periodontales, extracciones de dientes o lesiones en la mandíbula.

2.3. Definición de términos

Fitoterapéutico: Es todo aquel producto medicinal, cuya sustancia activa proviene de una o más especies vegetales, presentado en estado bruto o en forma farmacéutica y utilizado con fines terapéuticos.

Bromelina: Nombre genérico con el que se conoce a un grupo de enzimas proteolíticas pertenecientes al grupo de las sulfidril-proteasas. Se obtiene de los diferentes órganos de la piña, *Ananas comosus* (L.) Merr, mediante un proceso de centrifugación y liofilización. Presenta, *in vitro* e *in vivo*, actividad antiedematosa, antiinflamatoria, antitrombótica y fibrinolítica.

Infección odontogénica: Es aquella infección de la cavidad bucal que tiene su origen en el diente o en los tejidos que lo rodean íntimamente, progresa a lo largo del periodonto hasta el ápice, afectando al hueso periapical y desde esta zona se disemina a través del hueso y del periostio hacia estructuras vecinas o más lejanas. Su importancia radica en que puede ser el origen de infecciones que comprometan estructuras más alejadas (propagación por continuidad y a distancia) como infecciones intracraneales, retrofaríngeas, depósito sobre válvulas cardíacas (endocarditis), etc.

Terapia antibiótica: Es el tratamiento de los procesos infecciosos con antimicrobianos, realizado después de la selección óptima y juiciosa del antibiótico y de los conocimientos detallados de los factores farmacológicos y microbiológicos, estableciéndose una relación entre actividad

antibacteriana y concentración alcanzada por el antibiótico en el lugar de la infección. Se trata de una acción eminentemente etiológica, que busca la eliminación del organismo infectante sin que, en lo posible, se lesionen las células infectadas.

Clindamicina: Es un antibiótico de origen semisintético, derivada de la lincomicina. Se absorbe con rapidez y eficacia por vía oral, presentando actividad contra los aerobios grampositivos y una extensa gama de bacterias anaerobias, entre ellas los patógenos productores de betalactamasa, siendo eficaz en el tratamiento de las infecciones odontogénicas.

Concentración ósea: Es la cantidad de fármaco inalterado que llega al hueso a través de la circulación sistémica, después de su administración por diferentes vías. Esta cantidad de fármaco dependerá de la dosis administrada y de la absorción, distribución y eliminación, es decir de la farmacocinética del medicamento, así como la interacción con otros medicamentos.

2.4. Planteamiento del problema

2.4.1 Área Problema

Desde los albores de la humanidad y a través del tiempo, las plantas han sido siempre una fuente importante de sustancias con diversas

aplicaciones, fundamentalmente alimentarias y terapéuticas. El empleo de plantas medicinales y medicamentos herbarios ha tenido un marcado auge en el ámbito mundial, a partir de que la OMS planteó la introducción de recursos medicinales tradicionales en los sistemas de salud⁹ y por la evidencia científica de que los fármacos sintéticos provocan efectos negativos colaterales, apreciándose un mayor interés de las empresas farmacéuticas por la investigación de los productos vegetales, como fuentes de nuevos agentes fitoterapéuticos, garantizando su calidad, seguridad y eficacia.

En el Perú, así como en el resto del mundo, las plantas han formado parte importante en la alimentación y alivio de enfermedades. La gran diversidad biológica con la que cuenta nuestro país, por el número de especies y variedad de ecosistemas, ha motivado que hoy se difundan los estudios sobre las bondades que brindan las plantas, para el tratamiento de múltiples enfermedades⁵¹. Sin embargo, su participación en el mercado mundial de productos naturales es muy reducida. De las 1400 especies con propiedades medicinales de uso popular, sólo un pequeño porcentaje de estas y sus derivados se comercializan dentro y fuera del país⁵². Por ello, es obligación de los profesionales de la salud incrementar el número de estudios sobre medicamentos herbarios, para ampliar la base científica y así contribuir al mejor aprovechamiento de las especies vegetales.

Las plantas medicinales, también han sido utilizadas en Odontología como agentes antiinflamatorios, antibióticos, analgésicos, sedantes e irrigantes de uso endodóntico. A pesar de ello y que diversos estudios muestran grandes propiedades terapéuticas de los productos farmacológicos a base de plantas, la literatura es escasa en lo que respecta a la información sobre la calidad, seguridad y eficacia para su empleo en Odontología^{53,54}.

2.4.2 Delimitación del problema

Dentro de los derivados procedentes de las plantas, encontramos ciertas enzimas proteolíticas con interesantes aplicaciones terapéuticas, por lo que en la actualidad su uso es una tendencia mundial. Entre ellas tenemos a la bromelina, distribuida en los diferentes órganos de la piña tropical (*Ananas comosus* L. Merr.), con un amplio espectro de acciones farmacológicas e introducida como compuesto terapéutico en 1957.^{16,17}

La bromelina no es una sustancia sola, sino una colección de enzimas con diversas propiedades terapéuticas, demostradas en estudios “*in vitro*” e “*in vivo*”, tales como la actividad antiedematosa, antiinflamatoria, antitrombótica, antiagregante plaquetaria y fibrinolítica, entre otras, por lo que es utilizada como auxiliar en la recuperación de cirugías y diversos cuadros patológicos. Así mismo, diversos autores la emplean en sus investigaciones haciendo mención al efecto que puede

tener la bromelina en el mejor efecto clínico de los antibióticos (penicilinas y tetraciclinas) al ser administrados conjuntamente y por vía oral, debido quizás a la mejor absorción o al aumento de la permeabilidad en los tejidos; sin embargo, no existen estudios experimentales recientes que validen esta propiedad.

Por otra parte, en la práctica odontológica nos enfrentamos constantemente a infecciones, las cuales son un problema de salud pública y motivo de constante prescripción antibiótica. Por ello, los procesos infecciosos odontogénicos constituyen un problema complejo cuyo abordaje requiere la instauración de terapias con antimicrobianos de amplio espectro y con adecuados parámetros farmacocinéticos. Por tal motivo, la clindamicina se viene utilizando con mayor frecuencia, sobre todo en aquellos casos complejos donde los procesos infecciosos se localizan en el tejido óseo y los microorganismos son más resistentes, así como antibiótico de elección en los pacientes alérgicos a los betalactámicos.

2.4.3 Formulación del problema

¿Cuál es el efecto de la bromelina en la concentración sérica y ósea de clindamicina, una hora después de su administración conjunta por vía oral en ratas?

2.5. Justificación

En la actualidad, el aislamiento y purificación de productos naturales a partir de plantas para el empleo como recursos terapéuticos, es una vertiente muy importante de la medicina moderna; por ello, la bromelina, obtenido de la piña, se viene empleando desde mediados del siglo XX en diversas partes del mundo, generando un interés permanente por el estudio de sus propiedades medicinales; sin embargo, esto no se puede apreciar en el Perú, pues a pesar del conocimiento de las propiedades terapéuticas de esta enzima, no se han realizado trabajos de investigación en ningún campo de la Medicina.

Por otra parte, la posible relación de los procesos infecciosos odontogénicos con ciertas enfermedades sistémicas y la aparición cada vez más frecuente de bacterias resistentes y multiresistentes a uno o varios antibióticos, requieren un abordaje farmacológico eficaz, con terapias antimicrobianas de amplio espectro y adecuados parámetros farmacocinéticos. Por lo que proponemos el empleo de clindamicina conjuntamente con bromelina por vía oral, con la finalidad de mejorar su absorción y difusión del antibiótico en el lugar de la infección, mejorando su efectividad clínica. Debido a que no existen estudios experimentales recientes que respalden dicha propiedad de la bromelina y además, la clindamicina es un antibiótico diferente de los ya utilizados en los trabajos de investigación, donde emplean a la bromelina en combinación con un antibiótico, constituyendo la primera vez que se informa de la combinación terapéutica de ambos medicamentos.

2.6. Objetivos de la investigación

2.6.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la bromelina en la concentración sérica y ósea de clindamicina, una hora después de su administración conjunta por vía oral en ratas.

2.6.2 Objetivos Específicos

- Determinar la concentración sérica de clindamicina, una hora después de su administración por vía oral en ratas.
- Determinar la concentración sérica de clindamicina, una hora después de su administración conjunta con bromelina por vía oral en ratas.
- Determinar la concentración ósea de clindamicina, una hora después de su administración por vía oral en ratas.
- Determinar la concentración ósea de clindamicina, una hora después de su administración conjunta con bromelina por vía oral en ratas.
- Comparar las concentraciones séricas de clindamicina, una hora después de su administración sola y conjunta con bromelina por vía oral en ratas.

- Comparar las concentraciones óseas de clindamicina, una hora después de su administración sola y conjunta con bromelina por vía oral en ratas.

2.7. Hipótesis

La bromelina incrementa la concentración sérica y ósea de clindamicina, después de su administración conjunta por vía oral en ratas.

2.8. Operacionalización de la variable

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN OPERATIVA		INDICADOR	ESCALA	CATEGORÍA
Empleo de la Bromelina	Adición de la bromelina como coadyuvante a un antibiótico		Administración oral de la sustancia	Nominal	Presente Ausente
VARIABLE DEPENDIENTE	DIMENSIÓN	DEFINICIÓN OPERATIVA	INDICADOR	ESCALA	CATEGORÍA
Concentración de clindamicina	Concentración sérica de clindamicina	Concentración de clindamicina en suero, hallado una hora después de su administración por vía oral.	Cantidad de microgramo por mililitro. (µg/ml)	Razón	0 – 10 (µg/ml)

Concentración de clindamicina	Concentración ósea de clindamicina	Concentración de clindamicina en el hueso mandibular, hallado una hora después de su administración por vía oral.	Cantidad de microgramo por gramo ($\mu\text{g/g}$)	Razón	0 – 10 ($\mu\text{g/g}$)
-------------------------------	------------------------------------	---	--	-------	----------------------------

III. Metodología

3.1. Tipo de estudio

El presente trabajo es un estudio cuasiexperimental “*in vivo*” con grupo control, debido a que se manipularon las condiciones de la investigación en animales de experimentación, administrándole a unos un antibiótico (grupo de control positivo), a otros la sustancia a investigar junto con el antibiótico (grupo experimental) y a otros suero fisiológico (grupo de control negativo). Así mismo, es un estudio transversal y prospectivo, pues la recolección de las muestras se realizó en un momento determinado y después de aplicar los medicamentos por vía oral.

3.2. Población y muestra

El estudio se realizó en una población de 36 ratas albinas de raza Holtzman del Centro de Producción de Animales de Experimentación del Instituto Nacional de Salud (ver anexo N° 1).

Los animales seleccionados por conveniencia tuvieron las siguientes características: ratas machos, de 2 a 2 ½ meses de edad, cuyos pesos estaban entre 200 a 250 g, distribuidas de manera aleatoria en tres grupos de 12 animales cada uno.

Los animales permanecieron durante una semana dentro de las instalaciones del Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, para su adaptación (ver anexo N°6). Durante esa semana se mantuvieron bs cuidados y principios éticos para el trabajo con animales de laboratorio, en un ambiente de temperatura constante, con ciclos alternados de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, recibiendo una dieta normocalórica, normoproteica y agua *ad libitum*.

3.2.1 Unidad de análisis

Las muestras de suero y tejido óseo, fueron obtenidas de la sangre y tejido óseo mandibular de los animales de experimentación, una hora después de la administración oral de los medicamentos.

3.3. Materiales y equipos

✍ Materiales y equipos utilizados para obtención de muestras

- ✍ Balanza electrónica
- ✍ Congelador de – 40 °C
- ✍ Microcentrífuga de velocidad variable
- ✍ Cánula oro-esofágica de metal
- ✍ Instrumental quirúrgico esterilizado para disección
- ✍ Campos quirúrgicos estériles

- ✍ Mortero de cerámica estéril
- ✍ Campana de vidrio
- ✍ Tubos de ensayo de vidrio con tapa de baquelita de 15 ml
- ✍ Hojas de bisturí N° 15
- ✍ Éter dietílico
- ✍ Agua destilada
- ✍ Cloruro de sodio al 0.9%
- ✍ Algodón hidrófilo para uso medicinal
- ✍ Jeringas descartables de 3 ml y 5 ml
- ✍ Agujas 23 G

✍ **Materiales y equipos utilizados para ensayo microbiológico**

- ✍ Cabina de flujo laminar
- ✍ Balanza analítica
- ✍ Incubadora
- ✍ Agitador Vortex
- ✍ Autoclave
- ✍ Estufa eléctrica esterilizadora
- ✍ Espectrofotómetro
- ✍ Halómetro
- ✍ Micropipeta de 100 a 1000 μ L, 10 a 100 μ L y 0,5 a 5 mL
- ✍ pHmetro
- ✍ Mechero de Bunsen a gas
- ✍ Pipetas volumétricas estériles de 5, 10 y 25 mL

- ✍ Fiolas estériles de 5mL, 10mL, 25mL, 50mL, 100mL, 200mL, 250mL y 500mL
- ✍ Beaker de 100mL
- ✍ Tubos de 18 x 100mL
- ✍ Placas Petri de vidrio de 20 x 100 mm
- ✍ Cilindros estériles de acero inoxidable 06 x 08 x 10 mm \pm 0,1mm
- ✍ Pinza estéril
- ✍ Puntas estériles para pipetas automáticas, de 10 – 100 μ L, 100 – 1000 μ L y 500- 5 000 μ L
- ✍ Alcohol 70%
- ✍ Gasas
- ✍ Plumón de tinta indeleble

✍ **Medios de cultivo y diluyentes**

- ✍ Agar antibiótico N° 1 (*Laboratorio MERCK, ver anexo N° 2*)

Peptona	6,0 g.
Digerido pancreático de caseína	4,0 g.
Extracto de levadura	3,0 g.
Extracto de carne	1,5 g.
Dextrosa	1,0 g.
Agar	15,0 g.
Agua destilada	1000 mL

- ✍ Agar antibiótico N° 11 (*Laboratorio MERCK*): Contiene los mismos componentes que el Medio N° 1, a un pH $8,3 \pm 0,1$

✍ Solución Buffer N° 3 (0,1 M, pH 8,0): Se disolvió 16,73 g. de Fosfato Dibásico de Potasio y 0,523 g. de Fosfato Monobásico de Potasio en 1000 mL de agua. Se ajustó el pH Ácido fosfórico 18N o Hidróxido de potasio 10N a $8,0 \pm 0,1$.

✍ **Microorganismo para medio de cultivo**

✍ *Micrococcus luteus* con código ATCC 9341, mantenida y replicada en el Centro Nacional de Control de Calidad del Instituto Nacional de Salud.

✍ **Solución estándar**

✍ Estándar de Clorhidrato de Clindamicina (USP), a una potencia de 867 µg/mg, con Código CNCC 602.001.0311.002 del Instituto Nacional de Salud.

✍ **Agentes farmacológicos** (ver anexo N° 7)

✍ Bromelina (Fortilase®, comprimidos, Rottapharm|Madaus, Monza, Italia), cada comprimido contiene 50 mg de bromelina.

✍ Clindamicina (Clindamax®, cápsulas, AC Farma S.A., Lima, Perú), cada cápsula contiene 300 mg de clorhidrato de clindamicina.

3.4. Métodos

En el presente estudio, para medir la concentración de clindamicina de las diferentes muestras de suero y de tejido óseo de ratas, se empleó el método de potencia antibiótica (método cilindro-placa), un procedimiento de valoración microbiológica, similar a los utilizados por Zetner y cols. (2003)⁵⁰, Summersgill y cols. (1982)⁴² y O'Reilly y cols. (1992)⁴³, en sus respectivas investigaciones. Este procedimiento de valoración microbiológica (difusión en agar), consiste en la difusión radial de una solución de antibiótico desde un reservorio a través de una capa de agar, que ha sido inoculada con un microorganismo sensible al antibiótico. El método se empleó siguiendo de forma minuciosa las recomendaciones para ***Pruebas y Valoraciones Biológicas (Capítulo General 81 y 111)***, de la ***The United States Pharmacopeial XX and The National Formulary XV (1980)***⁵⁵, tomando en consideración una serie de factores, como la selección del microorganismo, la concentración, el medio de cultivo, la temperatura y el tiempo de incubación, el uso de Estándar de Referencia (USP) y otros factores que pueden influir en el resultado final.

3.4.1 Procedimientos y Técnicas

A. Administración de medicamentos (ver anexo N° 8)

Después de ser mantenidos en ayuno durante 12 horas, los animales fueron divididos en tres grupos experimentales (n=12), a los que se les

administró en dosis única y por vía oral, con auxilio de una jeringa de 3 ml acoplada a una cánula oro-esofágica de metal, los siguientes tratamientos planteados.

✍ **Grupo A (grupo control positivo)**, recibió una suspensión de clorhidrato de clindamicina a dosis de 90 mg/kg de peso.

✍ **Grupo B (grupo experimental)**, recibió una suspensión de clorhidrato de clindamicina a dosis de 90 mg/kg de peso conjuntamente con una suspensión de bromelina a dosis de 75 mg/kg de peso, mezclados previamente.

✍ **Grupo C (grupo control negativo)**, recibió solamente 1 ml de Cloruro de Sodio al 0.9%.

B. Procedimientos Quirúrgicos y obtención de muestras (ver anexo N°9)

Una hora después de haber administrado los medicamentos se procedió a obtener las muestras de suero y tejido óseo mandibular, previamente los animales fueron colocados en una campana de vidrio para ser anestesiados por inhalación de éter dietílico y luego sacrificados por dislocación cervical.

Preparación de las muestras

Una vez anestesiado el animal y antes de ser sacrificado, fue extraído mediante punción cardíaca, aproximadamente 5ml de sangre (ver anexo N° 10), la cual fue colocada en tubos de ensayo de vidrio (previamente autoclavados) y sometidos durante 20 minutos a temperatura ambiente, para su coagulación. Los tubos fueron centrifugados durante 10 minutos a 3500 rpm y seguidamente se retiró una muestra de 1ml de suero sanguíneo, para ser almacenado a - 20 °C hasta su análisis (ver anexo N° 11).


Se procedió a sacrificar a los animales por dislocación cervical (ver anexo N° 12), para obtener las muestras de tejido óseo. Después de la disección mediante procedimientos asépticos, se obtuvo el hueso mandibular, dejándolo libre de adherencias de tejido blando y de tejido dentario, siendo lavado por no más de 10 s con una solución salina estéril para eliminar cualquier resto de sangre, e inmediatamente fueron congelados a -20 °C hasta su posterior análisis. Después de retirado del congelador, los huesos fueron secados al aire a temperatura ambiente durante 1 hora y pulverizados con un mortero de acero esterilizado. Luego se obtuvo 1 g de hueso en polvo, con el que se realizó una suspensión, agregando 2 ml Fosfato de potasio buffer (0,1 mol/L, pH 8,0). Las suspensiones resultantes fueron analizadas en los medios de cultivo para medir su actividad antimicrobiana. (Ver anexos N°13 y N° 14)


C. Procedimiento microbiológico, método de potencia antibiótica (cilindro-placa)

Todos los procedimientos microbiológicos se llevaron a cabo en condiciones asépticas, siguiendo las buenas prácticas de laboratorio y cumpliendo con las medidas estándares de bioseguridad.


Preparación del Estándar (ver anexo N° 15)


Se pesó en la balanza analítica, una cantidad que correspondía a 28.96 mg de Clorhidrato de Clindamicina USP, se colocó en fiola estéril de 25 mL y se completó con agua destilada estéril hasta la marca correspondiente (concentración 1004 µg/mL). De esta concentración stock se tomó 1 mL y se colocó en una fiola de 100 mL, completando hasta la marca con la solución Buffer N° 3 estéril. Esta fue la dilución a partir de la cual se prepararon para el ensayo, 5 concentraciones finales o soluciones estándar, con una concentración entre diluciones sucesivas en proporción de 1:1,25, para el caso de valoración en cilindro-placa:

 Estándar 1 (S_1): 0,64 µg/mL

 Estándar 2 (S_2): 0,8 µg/mL

 **Estándar 3 (S_3) o dosis media: 1 µg/mL**

 Estándar 4 (S_4): 1,25 µg/mL

 Estándar 5 (S_5): 1,56 µg/mL

Preparación del inóculo

Se inoculó, a partir de un crecimiento reciente en agar inclinado o cultivo stock *Micrococcus luteus* ATCC 9341, la superficie de 250 mL de agar 11 contenido en un Frasco Roux. Luego se dispersó la suspensión con la ayuda de perlas de vidrio estériles por toda la superficie, se incubó a 32 - 35°C durante 24 horas. Al final de este período, se preparó la suspensión stock del microorganismo al coleccionar la superficie de crecimiento con 50 mL de solución salina estéril y luego se determinó la transmitancia de la solución a 560 nm, con un espectrofotómetro (ver anexo N° 3). Se ajustó la proporción contra la solución salina, de tal manera que el inóculo tendrá una transmitancia de aproximadamente 25% (1:40). Para el ensayo, se incorporó 1,5 mL del inóculo por cada 100 mL de medio 11 que fue licuado y mantenido a 45°C; se mezcló bien para obtener una suspensión homogénea, ésta constituyó la capa superficial de las placas para el ensayo.

Preparación de las placas (ver anexo N° 16)

Se prepararon 48 placas Petri estériles para el ensayo, rotulando por la base las posiciones equidistantes donde fueron colocados los cilindros de acero quirúrgico estériles, siendo 6 cilindros por cada placa. Se diferencié e intercalé las posiciones, donde tres correspondían al Estándar 3 (S₃) y las otras tres posiciones, correspondieron a las soluciones estándar o las muestras. Se colocaron 21 mL de medio 11 y se dejó solidificar

colocándolas sobre una superficie plana nivelada. Una vez solidificado, se agregó a cada placa 4 mL del agar preparado con el inóculo, y se dejó solidificar en la misma superficie.

Se colocaron los 6 cilindros estériles sobre la superficie del agar con ayuda de una pinza estéril. Se separaron las placas en grupos de 3 y se rotularon sus tapas con la solución del estándar o muestra que se colocaron en los cilindros, según muestra el gráfico.

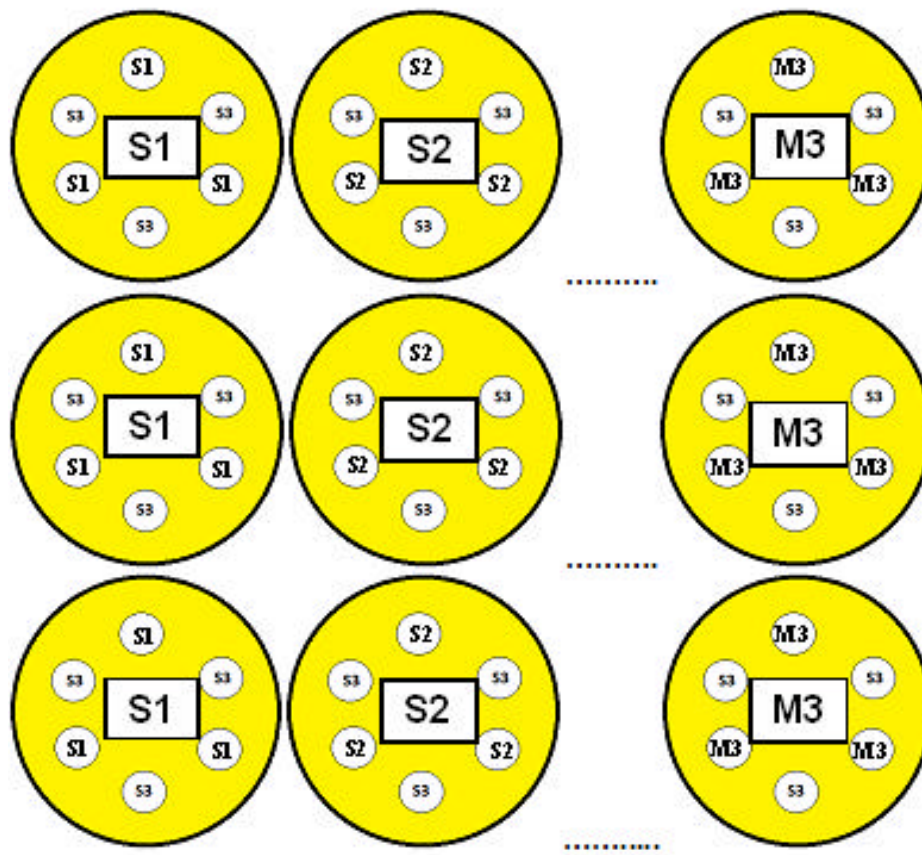


GRÁFICO 1. Esquema de distribución de las muestras en las placas Petri

Ensayo microbiológico: (Ver anexo N° 17)

En el interior de cada cilindro se colocó 100 µL de la dilución de estándar o muestra correspondiente al rotulado de cada placa y posteriormente, las placas fueron incubadas a 32 - 35°C durante 18 horas. Luego se descartaron los cilindros cuidadosamente en un contenedor con alcohol para ser desinfectados, lavados y esterilizados para uso posterior.

3.4.2 Análisis y Procesamiento de datos

Se realizó una ficha de datos en la cual se anotaron los resultados de la prueba de potencia antibiótica (ver anexo N° 4). La recolección de los datos se realizó de forma manual y visualmente.

Luego del tiempo de incubación, se verificó la formación de halos de inhibición alrededor de cada cilindro. El diámetro de esta zona de inhibición es directamente proporcional a la actividad bactericida de la clindamicina sobre el microorganismo empleado. Se midió cuidadosamente el diámetro de cada halo de inhibición con ayuda de un Halómetro (ver anexo N° 18), anotando los datos para hacer los cálculos correspondientes.

Con las medidas de los halos de inhibición de las 5 soluciones estándar y sus respectivas concentraciones, se preparó una curva de regresión lineal y se determinó la Pendiente e Intercepto, empleando el programa

Microsoft Excel 2010, similar a lo empleado por el Instituto Nacional de Salud (ver anexo N° 5). Con esta curva patrón y el valor conocido de la medida de los halos de inhibición, se calculó el valor de las concentraciones de clindamicina en las muestras de suero y tejido óseo. (Ver anexo N° 19)

Se realizó un análisis descriptivo de todos los datos obtenidos, hallando sus medias y desviaciones estándar. Luego, se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistics 20, para el análisis inferencial y verificar si existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos para los grupos experimentales, según cada unidad de análisis. Se aplicó la prueba estadística T de Student para grupos independientes, con un nivel de confianza del 95% y una significancia de 0,05, previa verificación de la distribución normal (test de Shapiro-Wilk) y la prueba de homogeneidad de las varianzas (Prueba de Levene).

IV. Resultados

CUADRO 1. DIÁMETROS DE HALOS DE INHIBICIÓN DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR.

Solución Estándar	HALOS DE INHIBICIÓN (mm)			
	S1	S2	S4	S5
1	18,8	20,9	24,3	25,0
2	18,2	20,1	24,0	25,2
3	18,1	21,0	23,9	25,1
4	18,0	21,1	24,7	24,9
5	18,8	20,5	24,8	25,0
6	19,0	20,5	24,3	24,9
7	18,0	20,8	24,5	24,5
8	18,5	20,5	24,0	24,5
9	18,5	20,9	23,0	24,0
Medias	18,4	20,7	24,2	24,8
Desv. Est.	0,38	0,32	0,54	0,38

CUADRO 1. Muestra los diámetros de los halos de inhibición y sus respectivos promedios, en mm, proporcionados por las diferentes soluciones estándar, concentraciones de clorhidrato de clindamicina USP (S1: 0,64 µg/mL, S2: 0,8 µg/mL, S4: 1,25 µg/mL, S5: 1,56 µg/mL). Se observa que a mayor es la concentración de la solución estándar, mayor es el diámetro del halo inhibitorio (desviación estándar entre 0,32 y 0,54).

**CUADRO 2. DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR 3 (S₃), EN
TODAS LAS PLACAS DE SIEMBRA.**

Soluciones estándar					Muestras de suero						Muestras de tejido óseo					
S3 - S1		S3 - S2	S3 - S4	S3 - S5	Grupo A			Grupo B			Grupo A			Grupo B		
					S3 - M(1)	S3 - M(2)	S3 - M(3)	S3 - M(1)	S3 - M(2)	S3 - M(3)	S3 - M(1)	S3 - M(2)	S3 - M(3)	S3 - M(1)	S3 - M(2)	S3 - M(3)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 X DE	22.0	22.1	23.0	23.0	22.3	22.1	22.5	22.2	22.1	22.0	22.3	22.0	22.0	22.2	22.4	22.2
	22.5	22.5	22.8	22.6	22.3	22.4	22.1	23.0	22.3	22.2	22.4	22.2	22.2	22.0	22.6	22.8
	21.9	22.5	22.9	22.6	22.5	22.0	22.3	22.1	22.0	21.0	22.2	22.4	21.8	23.0	22.2	22.8
	22.0	22.0	22.5	21.9	23.3	22.7	23.4	22.9	22.9	22.6	22.1	22.3	22.1	21.9	22.3	22.9
	22.3	22.5	22.7	22.0	23.0	22.8	23.2	22.0	22.0	21.8	22.2	22.2	22.4	23.0	22.5	23.0
	22.0	22.5	21.5	22.1	22.5	22.5	22.6	22.8	22.6	22.2	22.2	22.2	22.0	22.4	22.4	22.4
	22.5	22.1	22.5	22.0	22.7	22.4	22.7	22.5	21.9	21.9	22.8	22.1	22.2	21.8	21.8	21.8
	22.5	22.5	21.9	22.5	22.9	22.6	22.9	23.6	23.0	23.2	22.4	22.1	22.4	20.4	21.8	21.4
	23.0	22.7	22.6	22.0	22.0	22.3	22.4	22.9	22.9	22.7	22.6	22.4	21.6	23.5	21.5	22.0
22.3	22.4	22.5	22.3	22.6	22.4	22.7	22.7	22.4	22.2	22.4	22.2	22.1	22.2	22.2	22.4	
0.36	0.24	0.49	0.38	0.40	0.26	0.42	0.51	0.44	0.67	0.22	0.14	0.26	0.90	0.38	0.56	

CUADRO 2. Muestra los diámetros de los halos de inhibición y sus respectivos promedios (X), en mm, de la solución estándar 3 (S₃) o dosis media (1µg/mL), obtenida en todas las placas, tanto de las otras soluciones estándar como de las muestras de suero y tejido óseo. **El promedio del halo de inhibición final para S₃ fue 22,4 mm** (desviación estándar entre 0,14 y 0,90), empleado para la elaboración de la Curva de Regresión Lineal o Curva Patrón.

CUADRO 3. RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE CLINDAMICINA Y LAS MEDIAS DE HALOS DE INHIBICIÓN DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR.

Solución Estándar	Concentración de clindamicina (µg/ml)	Media de halo de inhibición (mm)
S₁	0,64277299	18,4
S₂	0,80346624	20,7
S₃	1,0043328	22,4
S₄	1,255416	24,2
S₅	1,56675917	24,8

CUADRO 3. Muestra las medias de los diámetros de halos de inhibición proporcionados por las diferentes concentraciones de clorhidrato de clindamicina USP de las soluciones estándar, empleadas para la elaboración de la Curva de Regresión Lineal o Curva Patrón. Cuanto mayor es la concentración de la solución estándar, mayor es el diámetro del halo inhibitorio.

GRÁFICO 2. CURVA DE REGRESIÓN LINEAL

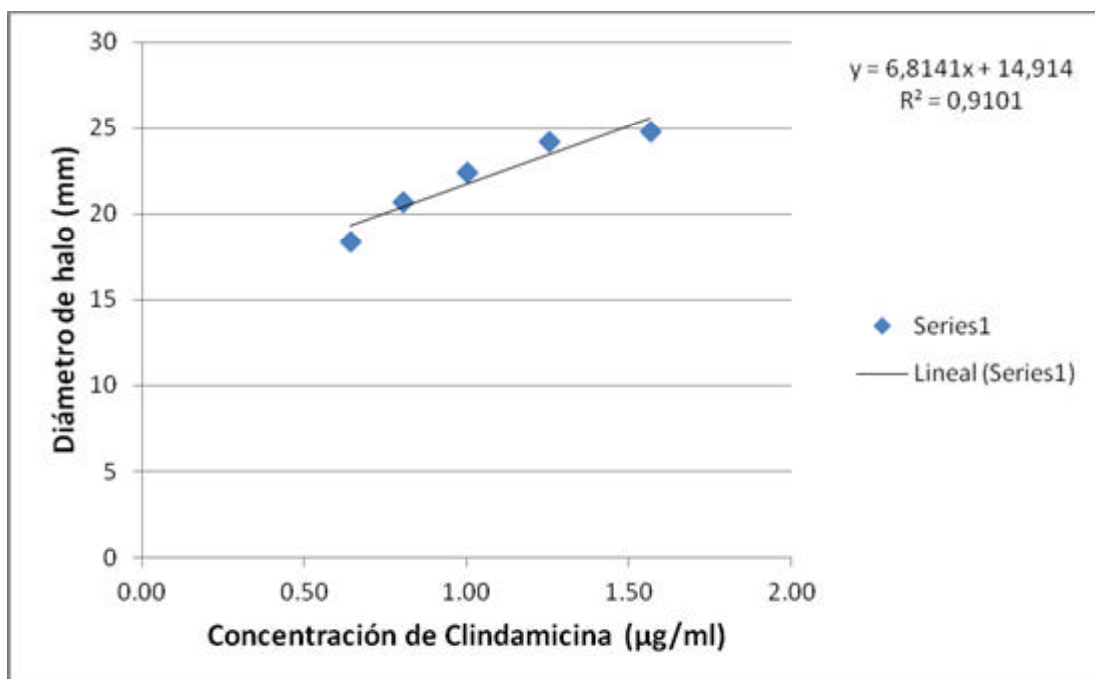


Gráfico 2. Ilustra la Curva de Regresión Lineal, establecida a partir de las concentraciones de clindamicina de cada solución estándar y sus respectivos promedios de los diámetros de los halos de inhibición.

Se plantea la ecuación matemática de la Curva de Regresión Lineal, para calcular las concentraciones desconocidas de clindamicina, en las muestras de suero y tejido óseo.

$$y = bx + a$$

Donde **y** es el diámetro del halo de inhibición, **x** es la concentración de clindamicina, **b** es la pendiente de la recta y **a** es el intercepto.

Se establece la ecuación, elaborada en el programa Microsoft Excel 2010, con los datos de las concentraciones de clindamicina y los medias de los diámetros de halos de inhibición de las soluciones estándar:

$$Y = 6,8141X + 14,914$$

Se realizó la prueba de linealidad de la Curva Patrón, determinando el coeficiente de correlación (r) igual a 0,9540, lo cual indicó un alto nivel de correlación entre las variables; por otra parte, se halló el coeficiente de determinación (r^2) igual a 0,9101.

Con la finalidad de obtener la cantidad necesaria para el estudio de cada muestra, se tuvo que juntar las muestras de suero y tejido óseo de cada 4 animales en cada grupo de experimentación, debido a que en el estudio piloto realizado previamente a la ejecución del trabajo, se observó que la cantidad de hueso mandibular por cada animal, eran insuficientes para los requerimientos del estudio. Por esta razón, al final se obtuvo 3 muestras de suero y 3 muestras de tejido óseo, por cada grupo de experimentación.

CUADRO 4. DIÁMETROS DE HALOS DE INHIBICIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUERO DEL GRUPO A (CLINDAMICINA SOLA)

Muestras	HALOS DE INHIBICIÓN (mm)		
	M (1)	M (2)	M (3)
1	28,0	27,5	28,2
2	28,0	27,8	28,4
3	28,2	27,3	28,7
4	27,2	26,8	27,8
5	27,8	27,4	28,6
6	27,2	26,9	27,9
7	28,5	27,4	28,7
8	28,8	27,6	28,4
9	28,3	27,6	28,8
Medias	28,0	27,4	28,4
Desv. Est.	0,54	0,33	0,36

CUADRO 4. Presenta los diámetros de los halos de inhibición y sus respectivas medias, en mm, para cada una de las muestras de suero del grupo A, animales a los que se les administró solamente clindamicina por vía oral.

Se puede apreciar que los diámetros de los halos de inhibición de las muestras, fueron mayores a los obtenidos con las soluciones estándar, por lo que no se encontraron dentro de los valores de la Curva de Regresión Lineal. De esta manera, se estimaron las concentraciones de clindamicina por extrapolación a partir de la ecuación de la recta.

CUADRO 5. CONCENTRACIÓN DE CLINDAMICINA EN LAS MUESTRAS DE SUERO DEL GRUPO A (CLINDAMICINA SOLA).

MUESTRAS	Media de halo de inhibición (mm)	Concentración de clindamicina (µg/ml)
M₁	28	1,920
M₂	27,4	1,832
M₃	28,4	1,979

CUADRO 5. Presenta las concentraciones de clindamicina y su relación con las medias del halo de inhibición de las muestras de suero del grupo A. Se determinó la concentración de clindamicina a partir de la aplicación de la ecuación de la recta (**$y = 6,8141x + 14,914$**), donde y: diámetro del halo de inhibición, x: concentración de clindamicina.

CUADRO 6. DIÁMETROS DE HALOS DE INHIBICIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUERO DEL GRUPO B (CLINDAMICINA CON BROMELINA)

	HALOS DE INHIBICIÓN (mm)		
Muestras	M (1)	M (2)	M (3)
1	25,2	25,5	26,7
2	25,7	26,0	26,4
3	25,5	25,4	25,9
4	25,6	25,3	26,5
5	25,4	25,2	26,8
6	26,0	26,1	26,7
7	26,3	26,6	27,1
8	25,9	25,9	26,8
9	26,1	26,5	27,2
Medias	25,7	25,8	26,7
Desv. Est.	0,36	0,51	0,39

CUADRO 6. Presenta los halos de inhibición y sus respectivas medias, en mm, para cada una de las muestras de suero del grupo B, animales a los que se les administró clindamicina conjuntamente con bromelina por vía oral.

Se puede apreciar que los diámetros de los halos de inhibición de las muestras, fueron mayores a los obtenidos con las soluciones estándar, por lo que no se encontraron dentro de los valores de la Curva de Regresión Lineal. De esta manera, se estimaron las concentraciones de clindamicina por extrapolación a partir de la ecuación de la recta.

**CUADRO 7. CONCENTRACIÓN DE CLINDAMICINA EN LAS
MUESTRAS DE SUERO DEL GRUPO B (CLINDAMICINA CON
BROMELINA).**

MUESTRAS	Media de halo de inhibición (mm)	Concentración de clindamicina (µg/ml)
M₁	25,7	1,583
M₂	25,8	1,598
M₃	26,7	1,730

CUADRO 7. Presenta las concentraciones de clindamicina en las muestras de suero del grupo B, determinadas a partir de la media de los halos de inhibición y empleando la ecuación de la recta ($y = 6,8141x + 14,914$), donde y: diámetro del halo de inhibición; x: concentración de clindamicina.

CUADRO 8. DIÁMETROS DE HALOS DE INHIBICIÓN DE LAS MUESTRAS ÓSEAS DEL GRUPO A (CLINDAMICINA SOLA).

	HALOS DE INHIBICIÓN (mm)		
Muestras	M (1)	M (2)	M (3)
1	15,0	15,3	15,9
2	15,3	15,2	15,7
3	15,1	15,1	16,0
4	15,0	15,0	15,8
5	15,0	15,0	16,2
6	15,6	15,5	15,9
7	15,4	15,2	16,4
8	15,7	15,4	15,7
9	15,5	15,5	16,0
Medias	15,3	15,2	16
Desv. Est.	0,28	0,19	0,23

CUADRO 8 Presenta los diámetros de los halos de inhibición y sus respectivas medias, en mm, para cada una de las muestras óseas del grupo A, animales a los que se les administró solamente clindamicina por vía oral. Se puede apreciar que los diámetros de los halos de inhibición de las muestras óseas, fueron menores a los obtenidos con las soluciones estándar, por lo que no se encontraron dentro de los valores de la Curva de Regresión Lineal. De esta manera, se estimaron las concentraciones de clindamicina por extrapolación a partir de la ecuación de la recta.

CUADRO 9. CONCENTRACIÓN DE CLINDAMICINA EN LAS MUESTRAS ÓSEAS DEL GRUPO A (CLINDAMICINA SOLA).

MUESTRAS	Media de halo de inhibición (mm)	Concentración de clindamicina (µg/g)
M₁	15,3	0,057
M₂	15,2	0,042
M₃	16	0,159

CUADRO 9. Presenta las concentraciones de clindamicina en las muestras óseas del grupo A, determinadas a partir de la media de los halos de inhibición y empleando la ecuación de la recta ($y = 6,8141x + 14,914$), donde y: diámetro del halo de inhibición, x: concentración de clindamicina.

**CUADRO 10. DIÁMETROS DE HALOS DE INHIBICIÓN DE LAS
MUESTRAS ÓSEAS DEL GRUPO B (CLINDAMICINA CON
BROMELINA).**

	HALOS DE INHIBICIÓN (mm)		
Muestras	M (1)	M (2)	M (3)
1	17,4	17,9	18,0
2	17,6	18,1	18,1
3	17,6	17,9	17,9
4	17,5	17,2	18,0
5	17,2	17,4	17,8
6	16,9	17,2	17,8
7	16,8	18,0	18,0
8	16,7	17,5	17,9
9	16,8	16,0	18,2
Medias	17,2	17,5	18,0
Desv. Est.	0,37	0,65	0,13

CUADRO 10. Presenta los diámetros de los halos de inhibición y sus respectivas medias, en mm, para cada una de las muestras óseas del grupo B, animales a los que se les administró clindamicina conjuntamente con bromelina por vía oral.

Se puede apreciar que los diámetros de los halos de inhibición de las muestras, fueron menores a los obtenidos con las soluciones estándar, por lo que no se encontraron dentro de los valores de la Curva de Regresión Lineal. De esta manera, se estimaron las concentraciones de clindamicina por extrapolación a partir de la ecuación de la recta.

**CUADRO 11. CONCENTRACIÓN DE CLINDAMICINA EN LAS
MUESTRAS ÓSEAS DEL GRUPO B (CLINDAMICINA CON
BROMELINA).**

MUESTRAS	Media de halo de inhibición (mm)	Concentración de clindamicina (µg/g)
M₁	17,2	0,335
M₂	17,5	0,379
M₃	18	0,452

CUADRO 11. Presenta las concentraciones de clindamicina en las muestras óseas del grupo B, determinadas a partir de la media de los halos de inhibición y empleando la ecuación de la recta ($y = 6,8141x + 14,914$), donde y: diámetro del halo de inhibición, x: concentración de clindamicina.

En la investigación se plantea el uso de un grupo C (grupo de control negativo) al cuál se le administró solamente 1 ml de solución salina y se procedió con las muestras, de manera similar a los otros grupos, donde no se apreciaron la formación de halos de inhibición en sus respectivas placas de siembra (ver anexos), tanto en las muestras de suero como de tejido óseo. Constatándose, que los animales no presentaban trazas de algún antibiótico. Demostrándose que la investigación no presenta falsos positivos.

CUADRO 12. COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE CLINDAMICINA ENTRE EL GRUPO A Y GRUPO B.

Concentración de clindamicina					
(µg/ml)					
	M 3 (1)	M 3 (2)	M 3 (3)	Media	D. Est.
GRUPO A	1,920	1,832	1,979	1,910	0,07
GRUPO B	1,582	1,597	1,729	1,636	0,08

CUADRO 12. Muestra las concentraciones de clindamicina y sus medias, obtenidas de las muestras séricas de los grupos experimentales A y B, después de la aplicación del método de potencia antibiótica. Observándose la disminución de la concentración de clindamicina en suero, después de la administración conjunta con bromelina .

Se realizó la **Prueba T de Student** para muestras independientes en SPSS, comparando las medias del grupo A (recibió clindamicina) y el grupo B (recibió clindamicina conjuntamente con bromelina). Previamente se realizó la verificación de supuestos de normalidad y de homogeneidad, determinando la **distribución normal** de las muestras, según Shapiro-Wilk, y la **igualdad de las varianzas**, según Levene. La realización de la prueba estadística dio un valor **p (0,012) < 0,05**, es decir una **disminución estadísticamente significativa** de la concentración de clindamicina en suero, después de la administración de bromelina.

CUADRO 13. COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES ÓSEAS DE CLINDAMICINA ENTRE EL GRUPO A Y GRUPO B.

Concentración de clindamicina					
(µg/g)					
	M 3 (1)	M 3 (2)	M 3 (3)	Media	D. Est.
GRUPO A	0,056	0,041	0,159	0,085	0,06
GRUPO B	0,335	0,379	0,452	0,388	0,06

CUADRO 12. Muestra las concentraciones de clindamicina y sus medias, obtenidas de las muestras óseas de los grupos experimentales A y B, después de la aplicación del método de potencia antibiótica. Observándose el incremento de la concentración de clindamicina en el tejido óseo, después de la administración conjunta con bromelina.

Se realizó la **Prueba T de Student** para muestras independientes en SPSS, comparando las medias del grupo A (recibió clindamicina) y el grupo B (recibió clindamicina conjuntamente con bromelina). Previamente se realizó la verificación de supuestos de normalidad y de homogeneidad, determinando la **distribución normal** de las muestras, según Shapiro-Wilk, y la **igualdad de las varianzas**, según Levene. La realización de la prueba estadística dio un valor **p (0,004) < 0,05**, es decir un aumento estadísticamente muy significativo de la concentración de clindamicina en el tejido óseo, después de la administración conjunta con bromelina.

GRÁFICO 3. MEDIAS DE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS Y ÓSEAS DE CLINDAMICINA DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES

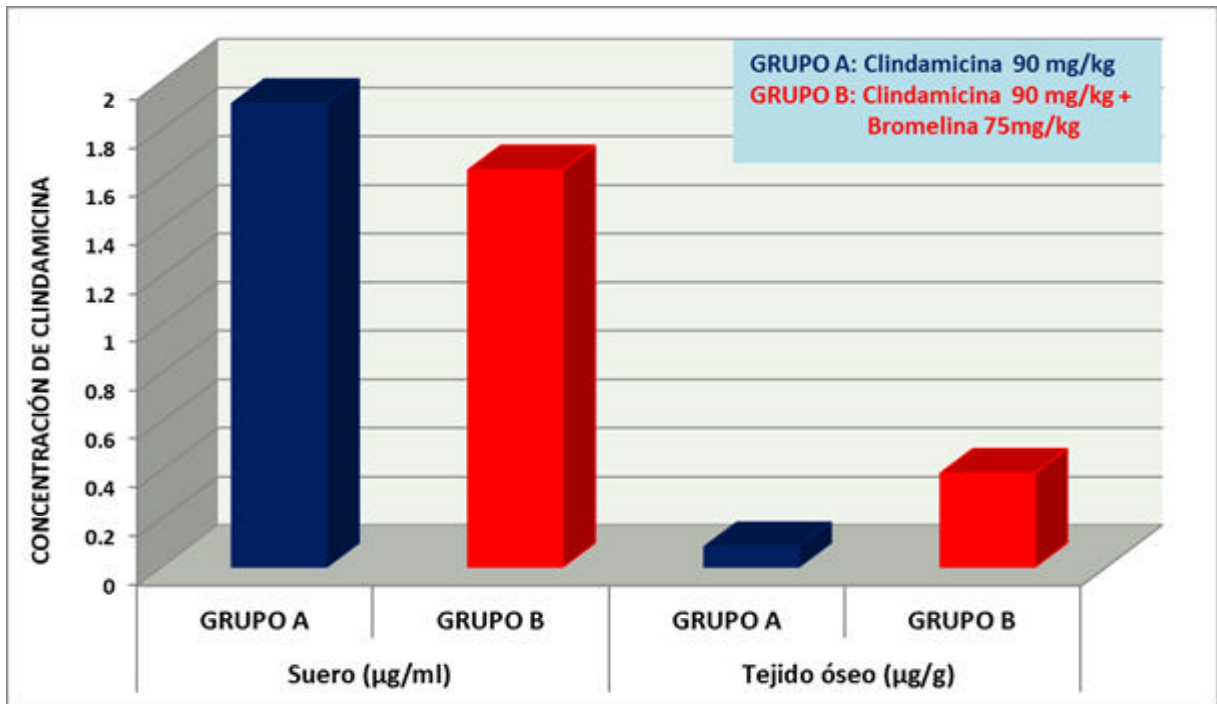


GRÁFICO 3. Muestra la relación entre las medias de las concentraciones séricas y óseas de clindamicina, de los grupos experimentales (A: Grupo al que se administró clindamicina, B: Grupo al que se administró clindamicina conjuntamente con bromelina). Se aprecia la disminución de la concentración del antibiótico en suero y al mismo tiempo el aumento de la concentración del antibiótico en el tejido óseo, después de la aplicación de bromelina.

V. Discusión

La información teórica sobre la bromelina, le atribuye entre otras virtudes, la propiedad de incrementar los niveles plasmáticos y tisulares de los antibióticos, especialmente de las penicilinas y tetraciclinas, administrados conjuntamente y por vía oral. Esta propiedad es aceptada desde la década de los 60's, a partir de las investigaciones realizadas por Neubauer¹ y Ryan², quienes realizaron estudios clínicos en pacientes con diferentes patologías y observaron que el empleo de bromelina en combinación con la terapia antibiótica, producía una recuperación más rápida de los pacientes o una reducción significativa de la morbilidad de los estadios de la enfermedad, en comparación a los tratados con una terapia antibiótica convencional.

En tal sentido, Renzinni y Varengo³, Luerti y Vignali⁴, Tinozzi y Venegoni⁵, realizaron también estudios clínicos, en los cuales midieron las concentraciones de amoxicilina y/o tetraciclina, después de la administración conjunta con bromelina y a dosis única. En todos los casos, las concentraciones fueron determinadas por métodos microbiológicos, a partir de muestras de plasma, de orina y de diversos tejidos. Todos ellos apreciaron un aumento en la concentración de los antibióticos, cuando son administrados con bromelina. Sin embargo, estos estudios no realizan un análisis estadístico formal, sino sólo una conclusión general, que la bromelina aumenta los niveles de amoxicilina y/o tetraciclina en plasma y otros tejidos. Por otra parte, no determinan si la acción de la bromelina es a nivel de la absorción y/o distribución tisular de los antibióticos.

En tal sentido, Bradbrook y cols.⁶ realizaron un estudio en 10 pacientes sanos, para determinar si la bromelina aumentaba los niveles de tetraciclina, en muestras de plasma y orina. Las muestras fueron obtenidas en diferentes momentos, hasta en un periodo de 72 horas, y analizadas mediante un método espectrofluorométrico, con un nivel de sensibilidad de 0,15 µg/ml a 5 µg/ml, observando, que las concentraciones individuales de tetraciclina, no muestran variaciones significativas después del análisis estadístico. Por lo que, la bromelina no hace alguna diferencia importante en la absorción o eliminación de la tetraciclina cuando es administra en una dosis de 80 mg.

Esta evidencia científica, nos hace suponer que la actividad sinérgica de la bromelina con los antibióticos, no está del todo clara, además porque no existen estudios experimentales recientes, que respalden dicha propiedad. Sin embargo, diversas investigaciones clínicas, como la de Sanders⁷, Shahid y cols.⁸, Risulo y cols.²³, Braun y cols.²⁴, hacen referencia a esta propiedad de la bromelina, debido a la mejora que muestran los pacientes al realizar la terapia combinada con bromelina en comparación al tratamiento convencional. Esto podría ser, debido a una disminución de la reacción inflamatoria local de forma significativa, así como del edema y el dolor, síntomas propios de un proceso infeccioso, y no por una mejora en la absorción o difusión de los antibióticos empleados en todos los casos.

En este sentido, se decide realizar el presente estudio experimental en ratas, con el objetivo de verificar el efecto de la bromelina en la concentración sérica y ósea de la clindamicina, una hora después de su administración conjunta y por

vía oral. Esta constituye la primera vez en que se informa de la combinación terapéutica de la clindamicina con bromelina.

Actualmente, la USP (The United States Pharmacopeial), recomienda el empleo de HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución) para medir la concentración de clindamicina; sin embargo, al no contar con las condiciones necesarias para realizar dicho método, optamos por el método microbiológico agar cilindro-placa, establecido en The United States Pharmacopeial XX and The National Formulary XV⁵⁵, y similar a los empleados por Summersgill y cols.⁴², O'Reilly y cols.⁴³, quienes también midieron la concentración de clindamicina en muestras de suero y tejido óseo, en diferentes condiciones.

Este ensayo microbiológico nos permitió establecer la concentración del antibiótico en las muestras de suero y tejido óseo, a partir del empleo de soluciones estándar, concentraciones de clorhidrato de clindamicina USP, y la formación de halos de inhibición, estableciendo una Curva de Regresión Lineal, pero así como a Zetner y cols.⁵⁰, donde los diámetros de las zonas de inhibición fueron más grandes que el mayor valor de las soluciones estándar. En nuestro estudio los datos obtenidos también se encontraron fuera de la curva patrón, siendo mayores para el caso de las muestras de suero y menores para las muestras de tejido óseo, por lo que, las concentraciones de clindamicina fueron estimadas por extrapolación.

Los resultados obtenidos muestran una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), produciéndose una disminución de la concentración de clindamicina

en el suero y un aumento de la concentración en el tejido óseo. Este hallazgo nos demuestra que efectivamente existe una acción aún no determinada, de la bromelina sobre la clindamicina, una acción que podría ser a nivel de la distribución o permeabilidad tisular del antibiótico.

VI. Conclusiones

- ? La bromelina disminuye la concentración sérica de clindamicina, después de su administración conjunta y por vía oral.
- ? La bromelina aumenta la concentración ósea de clindamicina, después de su administración conjunta y por vía oral.
- ? La farmacocinética de la clindamicina es afectada por la bromelina, modificando esta el nivel de distribución tisular del antibiótico a partir del plasma, incrementándolo una hora después de ser administrados conjuntamente.

VII. Recomendaciones

- ? Fomentar la investigación de productos vegetales con valor terapéutico, por ser fuente importante de sustancias activas para el tratamiento de enfermedades, impulsando su utilización.
- ? Complementar la presente investigación con estudios “in vitro” que establezcan el mecanismo de acción de la bromelina sobre los antibióticos.
- ? Realizar trabajos posteriores con una mayor cantidad de muestras, que permitan constatar los resultados obtenidos.

Referencias Bibliográficas

1. Neubauer RA. A plant protease for potentiation of and possible replacement of antibiotics. *Exp. Med. Surg.* 1961; 19:143–160.
2. Ryan RE. A double-blind clinical evaluation of bromelains in the treatment of acute sinusitis. *Headache: The Journal of Head and Face Pain.* April 1967; 7 (1):13–17
3. Renzinni G, Varengo M. Absorption of tetracycline in presence of bromelain after oral administration. *Arzneim-Forsch.* 1972; 22 (2):410-412
4. Luerti M, Vignali ML. Influence of bromelain on penetration of antibiotics in uterus, salpinx and ovary. *Drugs Expt Clin Res.* 1978; 4:45-48.
5. Tinozzi S, Venegoni A. Effect of bromelain on serum and tissue levels of amoxycillin. *Drugs Exp Clin Res.* 1978; 4: 39-44.
6. Bradbrook ID, Morrison PJ, Rogers HJ. The effect of bromelain on the absorption of orally administered tetracycline. *Br J Clin Pharmacol.* 1978 Dec; 6(6):552-554.⁶
7. Sanders HJ. Therapy of chlamydia infections with tetracyclines. *Int j exp clin chemother.* 1990; 3 (2): 101-106
8. Shahid SK, Turakhia NH, Kundra M, Shanbag P, Daftary GV, Schiess W. Efficacy and safety of Phlogenzym- a protease formulation, in Sepsis in Children. *J Assoc Physicians India.* 2002 Apr; 50:527-531
9. Morón FJ, Leyva M. *Farmacología general.* Editorial Ciencias Médicas. La Habana-Cuba. 2002

10. Bartholomew DP, Paull RE, Rohrbarch KG. The pineapple: botany, production, and uses. CABI Publishing. 2003
11. Pacheco A, Julca A, Romero V. Respuesta de dos variedades de piña (*Ananas comosus* L. merr) a la aplicación de fosfato de sechura en suelos de purma y monte real. Anales Científicos UNALM. Enero - Abril 2003; LIV: 276-287
12. Taussig SJ, Batkin S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. An update. J Ethnopharmacol. 1988 Feb-Mar;22(2):191-203.
13. López I, Díaz J, Merino F. La bromelina: una proteasa de interés comercial. Ciencia y Tecnología Alimentaria. Junio 1996; 1(2):17-22
14. Godoi, PH d. Estudo da atividade enzimática da bromelina pura em solução em diferentes temperaturas e ph. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Faculdade de Engenharia Química-Universidade Estadual de Campinas. 2007
15. López A, Lavado R. Determinación cuantitativa de los principales componentes de los extractos liofilizados de *Carica papaya* y *Ananas sativus* y su posible industrialización. Tesis de bachiller. Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM. Lima-Perú. 1964
16. Kelly GS. Bromelain: A Literature Review and Discussion of its Therapeutic Applications. Alt Med Rev. 1996; 1(4):243-257
17. Maurer HR. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 2001; 58: 1234–1245
18. Hernández M, Chávez M, Báez R, Carvajal C, Márquez M, Morris H, et al. Nueva tecnología para la obtención de un preparado de bromelina

- de tallo de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr). *Biotechnol. Apl.* 2003; 20(3):180–182
19. Neeser JR, German JB. *Bioprocesses and Biotechnology for Functional Foods and Nutraceuticals*. MARCEL DEKKER, INC. New York-USA. 2004
 20. Borrelli F, Capasso R, Severino B, Fiorino F, Aviello G, De Rosa G, Mazzella M, Romano B, Capasso F, Fasolino I and Izzo AA. (2011), Inhibitory effects of bromelain, a cysteine protease derived from pineapple stem (*Ananas comosus*), on intestinal motility in mice. *Neurogastroenterology & Motility*, 23: 745–e331.
 21. Fitzhugh DJ, Shan S, Dewhirst MW, Hale LP. Bromelain treatment decreases neutrophil migration to sites of inflammation. *Clinical Immunology*. July 2008. 128(1): 66-74
 22. Onken JE, Greer PK, Calingaert B, Hale LP. Bromelain Treatment Decreases Secretion of Pro-Inflammatory Cytokines and Chemokines by Colon Biopsies In Vitro. *Clin Immunol*. March 2008; 126(3): 345–352.
 23. Risulo M, Rubegni P, Sbrano P, Poggiali S, Fimiani M. Role of bromelain in the treatment of patients with pityriasis lichenoides chronica. *Journal of Dermatological Treatment*. 2007; 18: 219–222
 24. Braun JM, Schneider B, Beuth HJ. Therapeutic use, efficiency and safety of the proteolytic pineapple enzyme Bromelain-POS in children with acute sinusitis in Germany. *In Vivo*. Mar-Apr 2005; 19(2):417-421.
 25. Rowan AD, Buttle DJ, Barrett AJ. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochem. J.* 1990; 266: 869-875

26. Rowan AD, Buttle DJ. Pineapple cysteine endopeptidases. *Meth. Enzymol.* 1994; 244: 555–568
27. Silveira E. Purificação e caracterização de bromelina a partir do extrato bruto de *Ananas comosus* por adsorção em leito expandido. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química- Universidade Estadual de Campinas. 2007.
28. White RR, Crawley FE, Vellini M, et al. Bioavailability of ¹²⁵I bromelain after oral administration to rats. *Biopharm Drug Dispos.* 1988; 9: 397-403.
29. Castell JV, Friedrich G, Kuhn CS, Poppe GE. Intestinal absorption of undegraded proteins in men: presence of bromelain in plasma after oral intake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1997; 273:G139-G146
30. Van Kampen V, Merget R, Brüning T. Occupational allergies to bromelain. *Pneumologie.* 2007 Mar; 61(3):159-161
31. Abebe W. An overview of herbal supplement utilization with particular emphasis on possible interactions with dental drugs and oral manifestations. *J Dent Hyg.* 2003 Winter; 77 (1):37-46.
32. Hidaka M, Nagata M, Kawano Y, Sekiya H, Kai H, Yamasaki K, Okumura M, Arimori K. Inhibitory effects of fruit juices on cytochrome P450 2C9 activity in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008 Feb; 72(2):406-411.
33. Heck AM, DeWitt BA, Lukes AL. Potential interactions between alternative therapies and warfarin. *Am J Health Syst Pharm.* 2000 Jul 1;57(13):1221-1227

34. Inchingolo F, Tatullo M, Marrelli M, Inchingolo AM, Picciariello V, Inchingolo AD, Dipalma G, Vermesan D, Cagiano R. Clinical trial with bromelain in third molar exodontia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2010 Sep; 14(9): 771-774.
35. Navrátil L, Navrátilová B, Knížek J, Erösová Z, Fikácková H, Kymplová J. Possibilities of current use of non-invasive laser therapy and systemic enzymotherapy in stomatology. *Journal of Applied Biomedicine*. 2003; 1:13-19
36. Aráuz JFS. Estudo comparativo dos anti-inflamatorios de origem vegetal (bromelina, escina e papaina) em cirurgia. Dissertação de Mestrado em Farmacologia. Faculdade de de Odontologia de Piracaiba-Universidade Estadual de Campinas. 1982
37. Katzung B. *Farmacología Básica y Clínica*. Octava edición. Editorial el Manual Moderno. México D.F.-México. 2001.
38. Flórez J. *Farmacología humana*. Tercera edición. MASSON SA. Barcelona-España. 1997
39. Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Novena edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana.
40. Wynalda MA, Hutzler JM, Koets MD, Podoll T, Wienkers LC. In vitro metabolism of clindamycin in human liver and intestinal microsomes. *Drug Metab Dispos* 2003; 31: 878–887.
41. Nicholas P, Meyers BR, Levy RN, Hirschman SZ. Concentration of Clindamycin in Human Bone. *Antimicrobil Agent and Chemotherapy*. Aug. 1975; 8(2): 220-221

42. Summersgill JT, Schupp LG, Raff MJ. Comparative Penetration of Metronidazole, Clindamycin, Chloramphenicol, Cefoxitin, Ticarcillin, and Moxalactam into Bone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Apr. 1982; 21(4): 601-603
43. O'Reilly T, Kunz S, Sande E, Zak O, Sande MA, Täuber MG. Relationship between Antibiotic Concentration in Bone and Efficacy of Treatment of Staphylococcal Osteomyelitis in Rats: Azithromycin Compared with Clindamycin and Rifampin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Dec. 1992; 36(2):2693-2697.
44. Bascones A, Aguirre JM, Bermejo A, Blanco A, Gay-Escoda C, González-Moles MA. Documento de consenso sobre el tratamiento antimicrobiano de las infecciones bacterianas odontogénicas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2004; 9: 363-376.
45. Gualda MA, Carignano LS, Páez PL, Bezzi G, Paraje MG. Utilización de medicamentos en un programa de atención primaria de salud para poblaciones rurales marginales. *Lat. Am. J. Pharm.* 2010; 29 (1): 87-93
46. Ellison SJ. The role of phenoxymethylpenicillin, amoxicillin, metronidazole and clindamycin in the management of acute dentoalveolar abscesses--a review. *Br Dent J*. Apr 11, 2009; 206(7): 357-362
47. Khader RN, Rosenberg M; American Heart Association. The 2007 American Heart Association guideline for the prescription of antibiotic prophylaxis: a brief overview. *J Mass Dent Soc*. 2007 Fall; 56(3):34-46.

48. Brook I, Lewis MAO, Sándor GKB, Jeffcoat M, Samaranayake LP, Vera Rojas J. Clindamicina para el tratamiento de infecciones dentales. Rev. ADM. Nov.-Dic. 2007; 64(6):230-237.
49. Martens-Lobenhoffer J and Banditt P. Sensitive and specific determination of clindamycin in human serum and bone tissue applying liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization–mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2001 May 5; 755(1-2):143-149.
50. Zetner K, Schmidt H, Pfeiffer S. Concentrations of clindamycin in the mandibular bone of companion animals. Vet Ther. 2003 Summer; 4 (2):166-171.
51. Pamo-Reyna OG. Características de los trabajos publicados sobre las propiedades de las plantas en revistas médicas peruanas. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2009; 26(3): 314-23.
52. Palacios EE. Economía y plantas medicinales. Boletín CSI. 2004; 52: 28-31.
53. Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). Braz J Med Biol Res. 2000; 33: 179–189.
54. Groppo FC, Bergamaschi CdC, Cogo K. Franz-Montan M, Motta RHL, Andrade ED d. Use of phytotherapy in dentistry. Phytotherapy Research. 2008; 22: 993–998.
55. The United States pharmacopeia: The national formulary. Pharmacopoeia of the United States of America, United States Pharmacopeial Convention. XX. 1980

Anexos

ANEXO N° 1. CERTIFICADO SANITARIO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS
COORDINACIÓN DE BIOTERIO

CERTIFICADO SANITARIO N° 236-2011

Producto	: Rata Albina	Lote N°	: R - 11 - 2011
Especie	: <u>Rattus norvegicus</u>	Cantidad	: 40
Cepa	: Holtzman	Edad	: 2 a 2 meses 1/2
Peso	: 200 a 250 gr.	Sexo	: Machos
Boleta de Venta N°	: 13867 GR: 024549	Destino	: Universidad Nac. Mayor de San Marcos Lima
Lima	: 28-10-2011		

El Médico Veterinario, que suscribe, **Arturo Rosales Fernández**, Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias *.

*Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.

Chorrillos, 24 de Noviembre del 2011
(Fecha de emisión del certificado)

NOTA : El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.


M.V. Arturo Rosales Fernández
C.M.V.P. 1586

ANEXO N° 2. CERTIFICADO DE LABORATORIO DEL MEDIO DE CULTIVO



Certificate of Analysis

1.05272.0500 Antibiotic agar no. 1 for microbiology

Batch VM257072

Appearance

clearness

colour

pH-value (25 °C)

Solidification behaviour 2 hrs., 40 °C

Batch Values

clear

yellowish

6.5

liquid, inhomogeneous

Growth (Kocuria rhizophila ATCC 9341)

Inhibition zone diameter/Cephalexin 30 µg (Kocuria rhizophila ATCC 9341)

Inhibition zone diameter/Chloramphenicol 30 µg (Kocuria rhizophila ATCC 9341)

Inhibition zone diameter/Penicillin G 0.01 (Kocuria rhizophila ATCC 9341)

Inhibition zone diameter/Penicillin G 10 U/IE (Kocuria rhizophila ATCC 9341)

Growth (Staphylococcus aureus ATCC 6538-P)

Inhibition zone diameter/Cephalexin 30 µg (Staphylococcus aureus ATCC 6538-P)

Inhibition zone diameter/Chloramphenicol 30 µg (Staphylococcus aureus ATCC 6538-P)

Inhibition zone diameter/Penicillin G 0.01 (Staphylococcus aureus ATCC 6538-P)

Inhibition zone diameter/Penicillin G 10 U/IE (Staphylococcus aureus ATCC 6538-P)

Growth (Bacillus subtilis ATCC 6633)

Inhibition zone diameter/Cephalexin 30 µg (Bacillus subtilis ATCC 6633)

Batch Values

good

40 mm

35 mm

20 mm

48 mm

very good

28 mm

20 mm

14 mm

30 mm

very good

very good

Merck Peruana S.A.

Av. Los Frutales 220, Lima 11700

Teléfono : 51-1-6187500; Fax : 51-1-6164117

Página Web: www.merck.com.pe

Oficina Norte : Calle San Isidro 143

Of. 302 Urb. La Merced - Trujillo

Teléfono: (044) 295966 Fax: (044) 295967

Oficina Sur: Calle República de Chile 216, Dpto 303

La Negrita - Arequipa

Teléfono: (054) 201951 Fax: (054) 281524

MULTIPLAS

Date of release (DD.MM.YYYY): 09.06.2011

Expiry date (DD.MM.YYYY): 11.03.2016

Dr. Christian Arndt

responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0
SA-7 2227306/1052720000/000000 V. 914 Date: 09.06.2011

Page 1 of 1

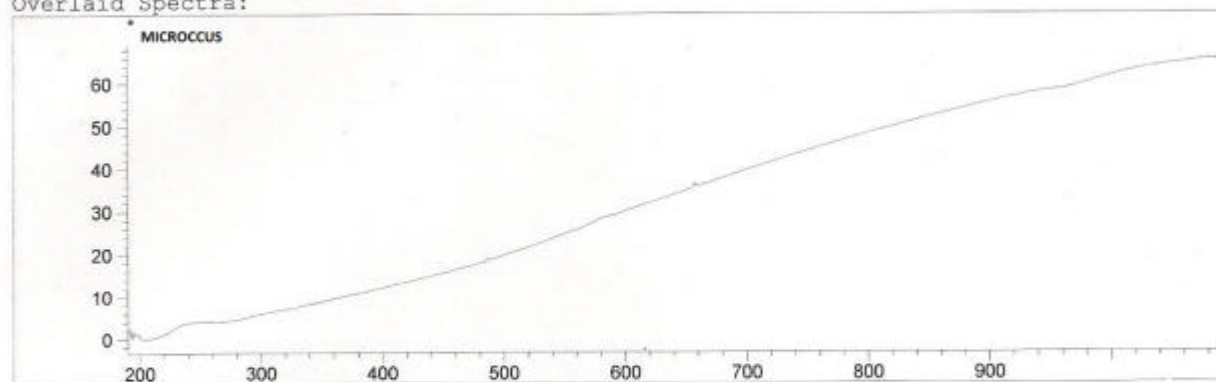
ANEXO N° 3. PRUEBA DE TRASMITANCIA EN ESPECTROFOTÓMETRO

Fixed Wavelength Report
CONCENTRACION DE CLINDAMICINA

Date 30/11/2011 Time 01:54:01 Page 1 of 1

Method file : <untitled>
Information :
Data File : <untitled>

Overlaid Spectra:



#	Name	%T<560nm>
1		25.70200

Report generated by : EDITH LAVADO

Signature:

*** End Fixed Wavelength Report ***

ANEXO N° 4. FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Grupo:_____ N° de animal:_____

Peso:_____ Fecha:_____


Hora de administración:_____

Dosis de Clindamicina:_____

Dosis de Bromelina:_____

	Muestra sérica	Muestra ósea
	Halos de inhibición	Halos de inhibición
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
Media de halo de inhibición	mm	mm
Concentración	µg/ml	µg/g

ANEXO N° 6. FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE POTENCIA ANTIBIÓTICA, EMPLEADO EN EL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

	FORMULARIO		FOR-CNCC-044																																																
	REPORTE DE RESULTADOS: POTENCIA ANTIBIOTICA METODO CILINDRO PLACA		Edición N° 05																																																
			Página 01 de 02																																																
Documento de Aprobación: Resolución Directoral N° 150-2010-CNCC/INS			Fecha: 2010-03-24																																																
I.- Para ser llenado por los analistas de la DELCC																																																			
PRODUCTO	MUESTRA DE CLINDAMICINA EN SUERO	PRESENTACION:																																																	
LOTE		FECHA DE VENCIMIENTO:																																																	
ORDEN DE SERVICIO		FECHA DE RECEPCION																																																	
FECHA DE ANALISIS	2011-12-13																																																		
MONOGRAFIA	: -----																																																		
METODO GENERAL	VALORACION MICROBIOLOGICA DE ANTIBIOTICOS <81>	Código CNCC:																																																	
NORMA	USP-34																																																		
1.	EQUIPOS UTILIZADOS: <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Equipos</th> <th>Código-CNCC</th> <th>Observaciones</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Incubadora</td> <td>LPA-10</td> <td>Informe de Calibracion N° 07-MI-INT/2011CNCC-INS</td> </tr> <tr> <td>Incubadora</td> <td>LLM-09</td> <td>Informe de Calibracion N° 06-MI-INT/2011CNCC-INS</td> </tr> <tr> <td>Cabina de flujo laminar</td> <td>LPA-04</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Vortex para agitacion</td> <td>LPA-02</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Autoclave horizontal</td> <td>SMB-06</td> <td>Informe de Validacion proceso esterilizacion N°001/2010</td> </tr> <tr> <td>Estufa electrica esterilizadora</td> <td>SMB-17</td> <td>Informe de Valid. proceso ester. y despirog. N°002/2010</td> </tr> <tr> <td>Balanza analitica</td> <td>BLZ-02</td> <td>CERTIFICADO DE CALIBRACION LM-026-2010</td> </tr> <tr> <td>Balanza analitica</td> <td>LLM-04</td> <td>CERTIFICADO DE CALIBRACION N°001MC-INT</td> </tr> <tr> <td>Ultrasonido</td> <td>LPA-27</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Agitador magnetico</td> <td>LPA-01</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Halometro</td> <td>LPA-13</td> <td>CERTIFICADO DE CALIBRACION N°001DI-INT-2011</td> </tr> <tr> <td>Micropipeta 100 a 1000uL</td> <td>LLM-29</td> <td>CERTIFICADO DE CALIBRACION N°002-INT-2010-CNCC-INS</td> </tr> <tr> <td>Micropipeta 10 a 100uL</td> <td>LPA-43</td> <td>CERTIFICADO DE CALIBRACION N°004-AV-INT-2010</td> </tr> <tr> <td>Micropipeta 0,5 a 5 mL</td> <td>LAL-30</td> <td>CERTIFICADO DE CALIBRACION LVD-870-020-AV-IM</td> </tr> <tr> <td>Espectrofotometro</td> <td>LPA-09</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Equipos	Código-CNCC	Observaciones	Incubadora	LPA-10	Informe de Calibracion N° 07-MI-INT/2011CNCC-INS	Incubadora	LLM-09	Informe de Calibracion N° 06-MI-INT/2011CNCC-INS	Cabina de flujo laminar	LPA-04		Vortex para agitacion	LPA-02		Autoclave horizontal	SMB-06	Informe de Validacion proceso esterilizacion N°001/2010	Estufa electrica esterilizadora	SMB-17	Informe de Valid. proceso ester. y despirog. N°002/2010	Balanza analitica	BLZ-02	CERTIFICADO DE CALIBRACION LM-026-2010	Balanza analitica	LLM-04	CERTIFICADO DE CALIBRACION N°001MC-INT	Ultrasonido	LPA-27		Agitador magnetico	LPA-01		Halometro	LPA-13	CERTIFICADO DE CALIBRACION N°001DI-INT-2011	Micropipeta 100 a 1000uL	LLM-29	CERTIFICADO DE CALIBRACION N°002-INT-2010-CNCC-INS	Micropipeta 10 a 100uL	LPA-43	CERTIFICADO DE CALIBRACION N°004-AV-INT-2010	Micropipeta 0,5 a 5 mL	LAL-30	CERTIFICADO DE CALIBRACION LVD-870-020-AV-IM	Espectrofotometro	LPA-09	
Equipos	Código-CNCC	Observaciones																																																	
Incubadora	LPA-10	Informe de Calibracion N° 07-MI-INT/2011CNCC-INS																																																	
Incubadora	LLM-09	Informe de Calibracion N° 06-MI-INT/2011CNCC-INS																																																	
Cabina de flujo laminar	LPA-04																																																		
Vortex para agitacion	LPA-02																																																		
Autoclave horizontal	SMB-06	Informe de Validacion proceso esterilizacion N°001/2010																																																	
Estufa electrica esterilizadora	SMB-17	Informe de Valid. proceso ester. y despirog. N°002/2010																																																	
Balanza analitica	BLZ-02	CERTIFICADO DE CALIBRACION LM-026-2010																																																	
Balanza analitica	LLM-04	CERTIFICADO DE CALIBRACION N°001MC-INT																																																	
Ultrasonido	LPA-27																																																		
Agitador magnetico	LPA-01																																																		
Halometro	LPA-13	CERTIFICADO DE CALIBRACION N°001DI-INT-2011																																																	
Micropipeta 100 a 1000uL	LLM-29	CERTIFICADO DE CALIBRACION N°002-INT-2010-CNCC-INS																																																	
Micropipeta 10 a 100uL	LPA-43	CERTIFICADO DE CALIBRACION N°004-AV-INT-2010																																																	
Micropipeta 0,5 a 5 mL	LAL-30	CERTIFICADO DE CALIBRACION LVD-870-020-AV-IM																																																	
Espectrofotometro	LPA-09																																																		
Parametro de control a ser evaluado por el analista Los equipos deben contar con sus respectivos certificados o informes según corresponda y cumplir con las tolerancias requeridas																																																			

2.

MATERIALES UTILIZADOS:

Materiales	Lote	Observaciones
Tips amarillo 10 - 100uL	/	ESTERILES
Tips azules 100 - 1 000uL		ESTERILES
Tips blancos 500- 5 000uL		ESTERILES
Pinzas de acero inoxidable		ESTERILES
Beaker de 100mL		ESTERILES
Tubos de 18 x 100mL		ESTERILES
Peras de decantación		ESTERILES
Pipeta lineal de 25mL		ESTERILES
Fiolas 5mL		VERIFICADA
Fiolas 10mL		VERIFICADA
Fiolas 25mL		VERIFICADA
Fiolas 50mL		VERIFICADA
Fiolas 100mL		VERIFICADA
Fiolas 200mL		VERIFICADA
Fiolas 250mL		VERIFICADA
Fiolas 500mL		VERIFICADA
Placas petri 90 x 20 mm		ESTERILES
Cilindros de acero inoxidable 06x 08 x 10 mm \pm 0,1mm		Informe de Verificación N°AMVO03-2011-CNCC
Gasas		ESTERILES

3. CEPA, ESTANDAR, MEDIOS DE CULTIVO, DILUYENTES Y REACTIVOS UTILIZADOS:**3.1 Estandar**

NOMBRE	CLINDAMICINA	N° LOTE:		FECHA VENC.	2013-10
PUREZA/POTENCIA	867 ug/mg	N° LOTE:	-----	% DE AGUA	
		N° LOTE:		CÓDIGO CNCC	602.001.0311.002

3.2 Medios de cultivo, diluyentes y reactivos

AGAR ANTIBIOTICO N°	1	N° LOTE:	00016177	FECHA VENC.	2012-04
AGAR ANTIBIOTICO N°	11	N° LOTE:	VM010569	FECHA VENC.	30/07/2013
DILUYENTE	FOSFATO MONOBASICO	N° LOTE:	H21149	FECHA VENC.	13/07/2014
DILUYENTE	FOSFATO DIBASICO	N° LOTE:	H21COO84	FECHA VENC.	13/09/2014
Solucion salina		N° LOTE:		FECHA VENC.	
REACTIVO	-----	N° LOTE:	-----	FECHA VENC.	-----
	-----	N° LOTE:	-----	FECHA VENC.	-----

3.3 Cepa

NOMBRE	Micrococcus luteus	Codigo ATCC	9341	CÓDIGO CNCC:	
--------	--------------------	-------------	------	--------------	--

Parametro de control a ser evaluado por el analista

Todos los reactivos deben contar con sus respectivos certificados de analisis o cumplimiento

4. PRUEBA PRELIMINAR

- 1.- Sembrar la cepa en un tubo con el agar indicado e incubara por 24 horas
- 2.- Lavar el tubo con 3 mL de solución salina fisiológica estéril y sembrar esta suspensión en un frasco roux con 250mL del medio indicado e incubar por 24 horas
- 3.- Cosechar con 50 mL de solución salina fisiológica estéril.

5. PRUEBA PRINCIPAL

5.1 Diluciones del Estandar

Estandar

Peso	28.96	mg
Peso real		
Volumen	25	
Concen. Soluc. Estandar S	1004.3328	ug/mL
Concentración Final	5mL(50)	
	100.43328	ug/mL

S1	0.32	mL (50)	0.6427730	ug/mL
S2	0.4	mL (50)	0.8034662	ug/mL
S3	0.5	mL (50)	1.0043328	ug/mL
S4	0.625	mL (50)	1.2554160	ug/mL
S5	0.78	mL (50)	1.5667592	ug/mL

5.2 Datos de la muestra y diluciones

160 mg/2mL


Se toma 1.25 mL de la muestra que equivale a 100 mg

MUESTRA 1

SE ASUME QUE LA CONC	1	mg/mL
	100	ug/mL
	1	ug/mL
M1	1	ug/mL

MUESTRA 2

	1	mg/mL
	100	ug/mL
	1	ug/mL
M2	1	ug/mL

	FORMULARIO		FOR-CNCC-044
	REPORTE DE RESULTADOS: POTENCIA ANTIBIOTICA METODO CILINDRO PLACA		Edición N° 05
			Página 02 de 02
Documento de Aprobación: Resolución Directoral N° 150-2010-CINCINS			Fecha: 2010-03-24
L.- Para ser llenado por los analistas de la DELCC			
PRODUCTO	MUESTRA SUERO CLINDAMICINA + BROMELINA	PRESENTACION:	0
LOTE		FECHA DE VENCIMIENTO:	2013-09-01
ORDEN DE SERVICIO		FECHA DE RECEPCION	2011-09-20
FECHA DE ANALISIS	2011-12-13		

4.3 CURVA STANDARD

Cantidad declarada: 160 mg/2mL

4.3.1 Datos de laboratorio

Datos	HALOS DE INHIBICION EN mm											Concentra.	Log Cc	Y
	S1	S3	S2	S3	S4	S3	S5	S3	M3 (1)	S3 - M3(1)	M3 (2)	S3 - M3(2)		(Yt correg)
1	18.8	22.0	20.9	22.1	24.3	23.0	25.0	23.0	28.0	22.3	27.5	22.3	S1	0.642772992
2	18.2	22.5	20.1	22.5	24.0	22.8	25.2	22.6	28.0	22.3	27.8	22.3	S2	0.803466240
3	18.1	21.9	21.0	22.5	23.9	22.9	25.1	22.6	28.2	22.5	27.3	22.5	S3	1.004332800
4	18.0	22.0	21.1	22.0	24.7	22.5	24.9	21.9	27.2	23.3	26.8	23.3	S4	1.255416000
5	18.8	22.3	20.5	22.5	24.8	22.7	25.0	22.0	27.8	23.0	27.4	23.0	S5	1.566759168
6	19.0	22.0	20.5	22.5	24.3	21.5	24.9	22.1	27.2	22.5	26.9	22.5	M3 (1)	1.000000000
7	18.0	22.5	20.8	22.1	24.5	22.5	24.5	22.0	28.5	22.7	27.4	22.7	M3 (2)	1.000000000
8	18.5	22.5	20.5	22.5	24.0	21.9	24.5	22.5	28.8	22.9	27.6	22.9		
9	18.5	23.0	20.9	22.7	23.0	22.6	24.0	22.0	28.3	22.0	27.6	22.0		
X	18.4	22.3	20.7	22.4	24.2	22.5	24.8	22.3	28.0	22.6	27.4	22.6		
												22.45		

Ppm ug Conc	ESTIMACION LINEAL
18.43	0.00174
20.70	0.00174
22.45	0.00174
24.17	0.00174
24.79	0.00174
28.00	0.00174
27.37	0.00174

4.3.2 Hallando el valor de la Pendiente " b "

$$Y_L = \frac{\sum x \cdot y_t}{\text{divisor}} \quad Y_H = \frac{\sum x \cdot y_t}{\text{divisor}}$$

Y_L : Respuesta promedio de la menor dosis del standard
Y_H : Respuesta promedio de la mayor dosis del standard
Y_t : Respuesta promedio para cada dosis del standard
divisor : número de dosis

X _i =	Coeficiente por cada Y _t del estandar para Y _L y Y _H					Divisor
Dosis = 5						
Y _L =	3	2	1	0	-1	5
Y _H =	-1	0	1	2	3	5

Y_L = 18.87 X_L = Log de la menor dosis = -0.19
Y_H = 25.34296 X_H = Log de la mayor dosis = 0.20

$$b = \frac{Y_H - Y_L}{X_H - X_L}$$

4.3.3 Hallando el valor de

$$\bar{y} = \frac{Y_L + Y_H}{2} = 22.1074$$

$$b = 16.723610$$

4.3.4 Hallando el valor de

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{k} = 0.001739$$

x = Log10 de las concentraciones
k = número de dosis

4.4 PRUEBA DE LINEALIDAD DE LA CURVA ESTANDAR (COEFICIENTE DE DETERMINACION)

Coeficiente de determinación $r^2 = 0.9689$ Coeficiente de correlación $r = 0.9843$

Significancia de la pendiente:

H₀: B₁ = 0 (El parámetro B₁ no es significativo) $t_{exp} = \frac{b}{S_b} = 9.660$

H₁: diferente de 0 (El parámetro B₁ es significativo)

S_b = Desviación estándar de la pendiente

$$t_{(0.975; 3)} = 3.18$$

$$t_{exp} > t_{(0.975; 3)}$$

Si el $t_{exp} > t_{(0.975; 3)}$, se rechaza la H₀, y se concluye que el parámetro B₁ (pendiente) es significativo.

ANOVA Regresión

H₀: El MRLS no es adecuado

H₁: El MRLS es adecuado

MRLS: Modelo de Regresión Lineal Simple

$$F_{exp} = 93.33$$

$$F_{(0.95; 1; 3)} = 10.13$$

$$F_{exp} > F_{(0.95; 1; 3)}$$

Si $F_{exp} > F_{(0.95; 1; 3)}$ rechazamos la H₀ y concluimos que el MRLS es adecuado.

El MRLS es adecuado

4.5 POTENCIA INTERPOLADA A PARTIR DE LA CURVA ESTANDAR (M')

$$Y = \bar{y} + b(x - \bar{x})$$

$$Y(M3(1)) = 22.0783$$

$$Y(M3(2)) = 22.0783$$

Respuesta según la curva estandar para el M3

$$\text{Sumatoria (X) M3 (1)} = 3.1868124$$

$$\text{Sumatoria (X) M3 (2)} = 2.8459769$$

$$M = \frac{\sum X}{f}$$

M' (M3 (1)) = 0.3540903
M' (M3 (2)) = 0.3162197

Y_s = Respuesta teorica obtenida al reemplazar en la curva estandar el log-dosis (X) de la muestra

x = log concentración de M3

Y_u = Respuestas de la dosis de la muestra (valores de la muestra de halos obtenidos en la prueba del ensayo)

$$X = \frac{y_u - Y_s}{b}$$

	X (M3 (1))	X (M3 (2))	X ² (M3 (1))	X ² (M3 (2))
X ₁ =	0.35409	0.32419	0.12538	0.10510
X ₂ =	0.35409	0.34213	0.12538	0.11705
X ₃ =	0.36605	0.31223	0.13399	0.09749
X ₄ =	0.30625	0.28234	0.09379	0.07971
X ₅ =	0.34213	0.31821	0.11705	0.10126
X ₆ =	0.30625	0.28831	0.09379	0.08313
X ₇ =	0.38399	0.31821	0.14745	0.10126
X ₈ =	0.40193	0.33017	0.16155	0.10901
X ₉ =	0.37203	0.33017	0.13841	0.10901
Sumatoria X	3.18681	2.84598	1.13679	0.90303

$$(\text{Sumatoria X})^2 = T_x$$

$$10.15577 \quad 8.09958$$

4.6 POTENCIA DE LA MUESTRA (P*)

$$M = M' + \text{Log R}$$

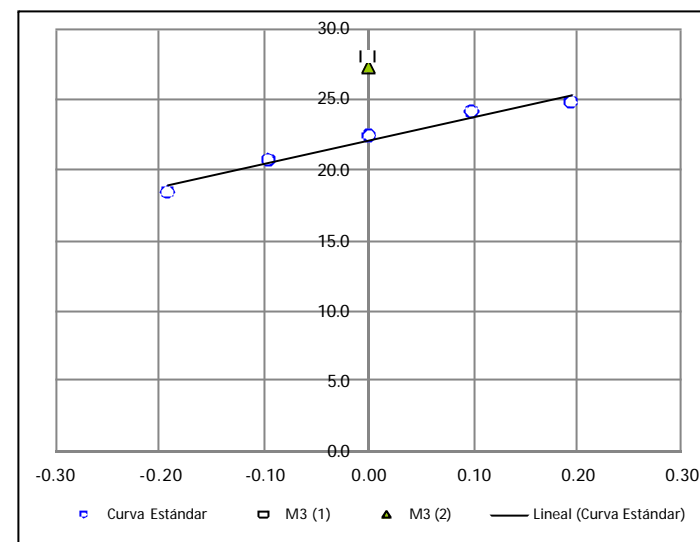
M' (M3 (1)) = 0.35409 R (M3 (1)) = 1.004
M' (M3 (2)) = 0.31622 R (M3 (2)) = 1.004

Log R (M3 (1)) = 0.0019
Log R (M3 (2)) = 0.0019

M (M3 (1)) = 0.355968
M (M3 (2)) = 0.318097

$$P^* = \text{Antilog M}$$

P* (M3 (1)) = 2.26970
P* (M3 (2)) = 2.08016



4.7 VARIANZA

$$n = f - h$$

$$(f = \quad h = \quad)$$

h = número de muestras ensayadas (1)

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n X_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n X_i)^2}{n}}{n-1}$$

$$s^2 (M3 (1)) = 0.00105$$

$$s^2 (M3 (2)) = 0.00038$$

$$s (M3 (1)) = 0.03234$$

$$s (M3 (2)) = 0.01961$$

4.8 INTERVALO DE CONFIANZA (p=0,05)

$$M \pm \frac{1}{2} L$$

$$L = \frac{2 \cdot s \cdot t}{\sqrt{k}}$$

$$L (M3 (1)) = 0.04972$$

$$L (M3 (2)) = 0.03014$$

$$M (M3 (1)) = 0.355968$$

$$M (M3 (2)) = 0.318097$$

$$\pm 0.0248583$$

$$+ 0.0150700$$

4.9 RESULTADO:

Cuando se realice varias valoraciones del mismo material con la misma curva estándar, calcular el coeficiente de variación de las valoraciones.

Porcentaje encontrado

M3 (1) = 226.97 %

M3 (2) = 208.02 %

CV = 6.2 %

Cantidad encontrada

363.152 mg/2mL

332.832 mg/2mL

Intervalos de Confianza

214.34 -- 240.34 %
(342.9488 -- 384.544 mg/2mL)

200.92 -- 215.36 %
(321.4752 -- 344.5776 mg/2mL)

Coherencia mutua

Los intervalos de confianza se superponen, las estimaciones pueden ser combinadas.

Potencia Promedio ponderada M3 (1) y M3 (2) = 217.5 %

348 mg/2mL

207.63 -- 227.85 %
(332.212 -- 364.561 mg/2mL)

Incertidumbre \pm 4.7 % (*)

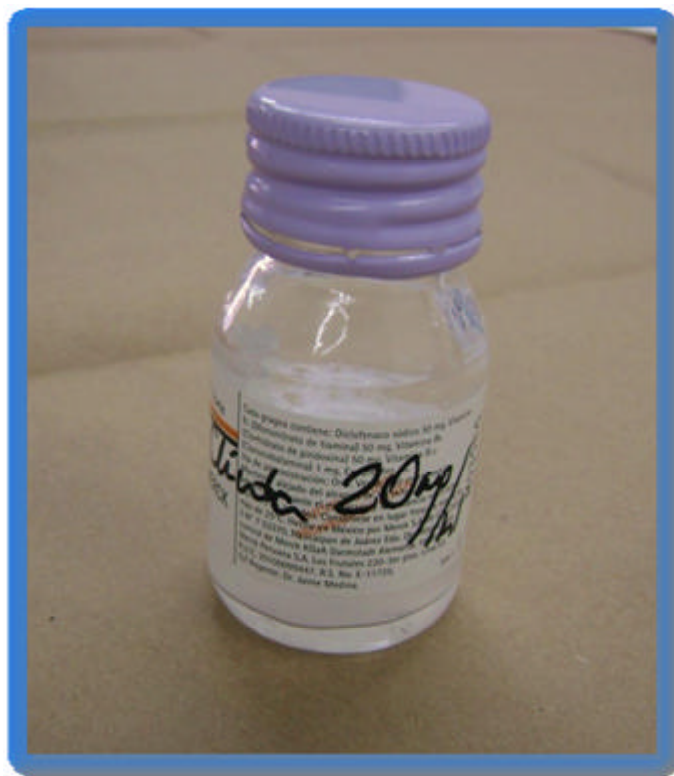
**ANEXO N° 6. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN EN LAS
INSTALACIONES DEL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA DE LA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA-UNMSM.**



ANEXO N° 7. AGENTES FARMACOLÓGICOS



Comprimidos de Bromelina



Cápsulas de Clindamicina

ANEXO N° 8. ADMINISTRACIÓN DE MEDICAMENTOS



Sujeción del animal para la administración del medicamento



Administración de medicamento mediante cánula oroesofágica.

ANEXO N° 9. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS



**Sedación del animal de experimentación por inhalación de éter dietílico,
en campana de vidrio**



Animal de experimentación anestesiado

ANEXO N° 10. TOMA DE MUESTRA DE SANGRE



Extracción de sangre mediante punción intracardiaca, aproximadamente

5ml

ANEXO N° 11. MUESTRA DE SANGRE EN TUBOS DE ENSAYO.

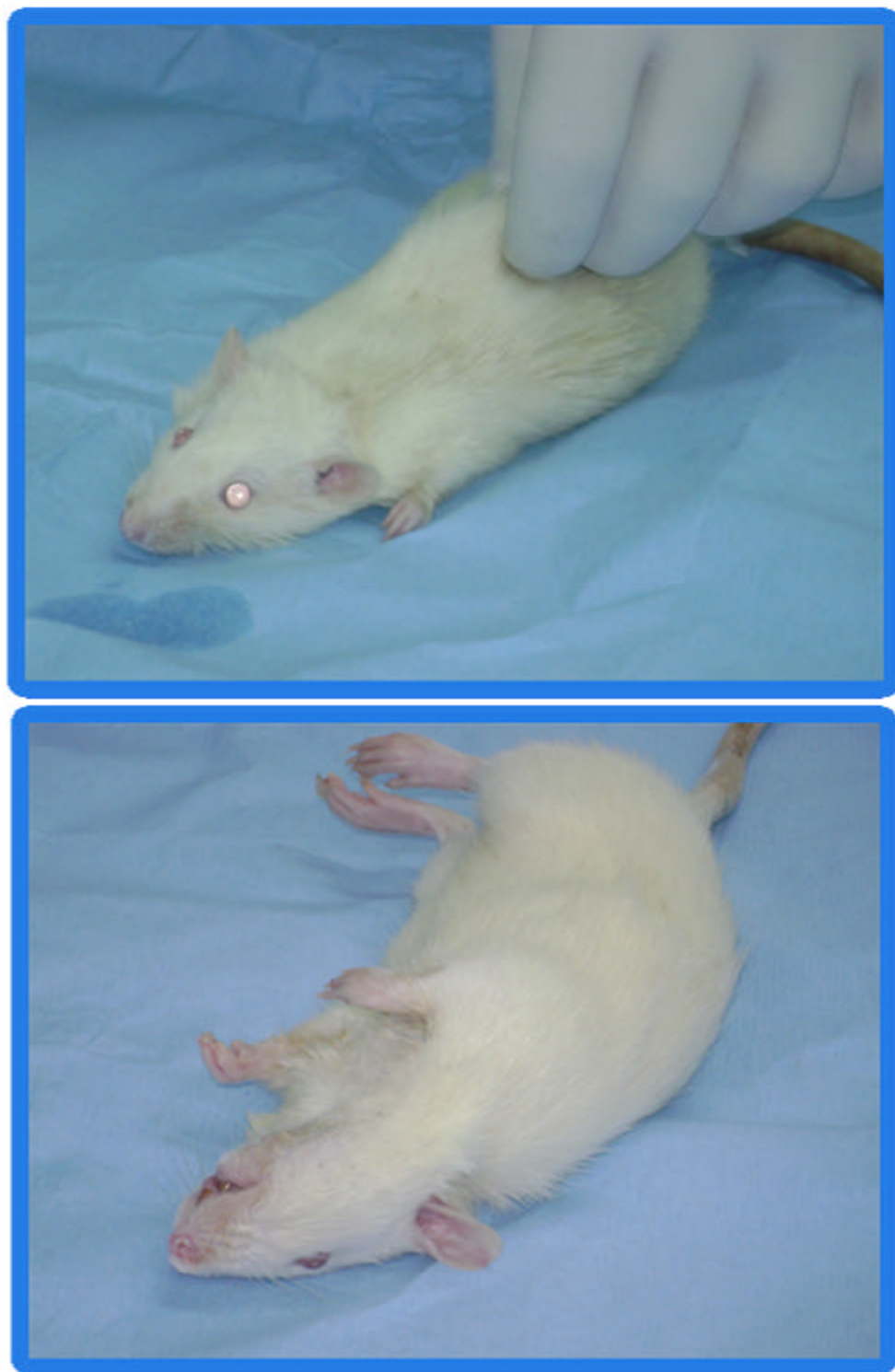


Colocación de muestra sanguínea en tubo de ensayo estéril



Tubos de ensayo con las muestras sanguíneas centrifugadas durante 10 minutos a 3500 rpm. Luego se retiró una muestra de 1ml de suero sanguíneo, para ser almacenado a - 20 °C hasta su análisis

**ANEXO N°12. DISLOCACIÓN CERVICAL DE ANIMAL DE
EXPERIMENTACIÓN**



**Sacrificio de la rata mediante dislocación cervical, previa obtención del
hueso mandibular**

ANEXO N° 13. PREPARACIÓN DE MUESTRA DE TEJIDO ÓSEO



Disección del hueso mandibular, para obtención de la muestra de tejido óseo.



Hueso mandibular con restos de tejido blando y tejido dentario.

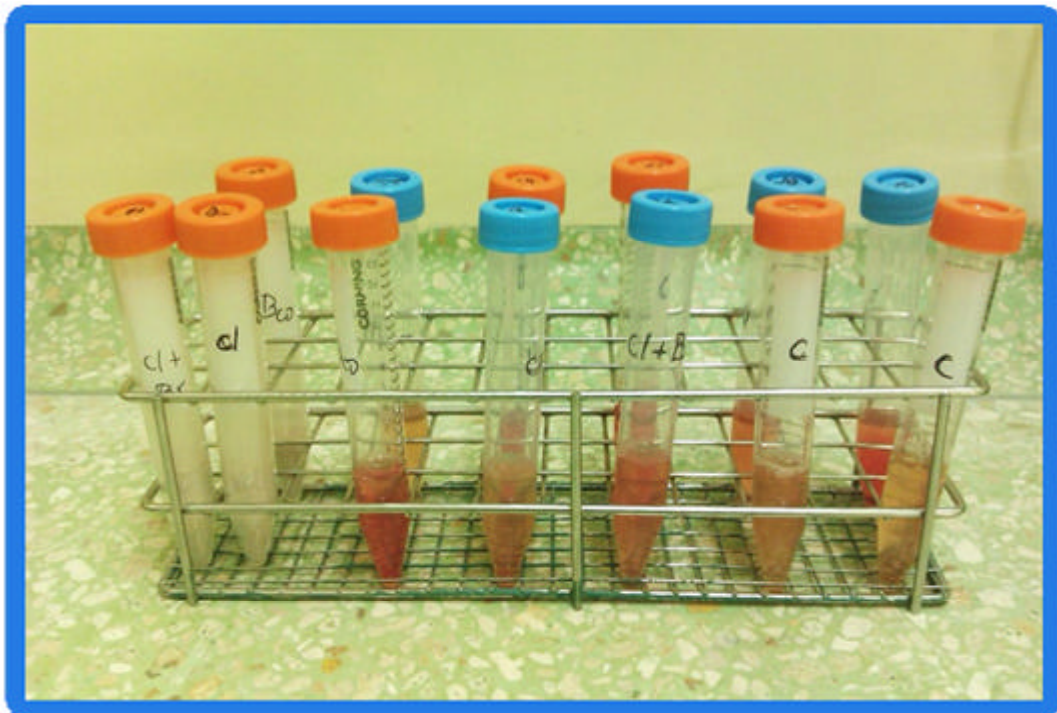


Hueso mandibular libre de restos de tejido blando



Muestras de hueso cortical mandibular secado al medio ambiente, luego fueron congelados a - 20°C y posteriormente pulverizados

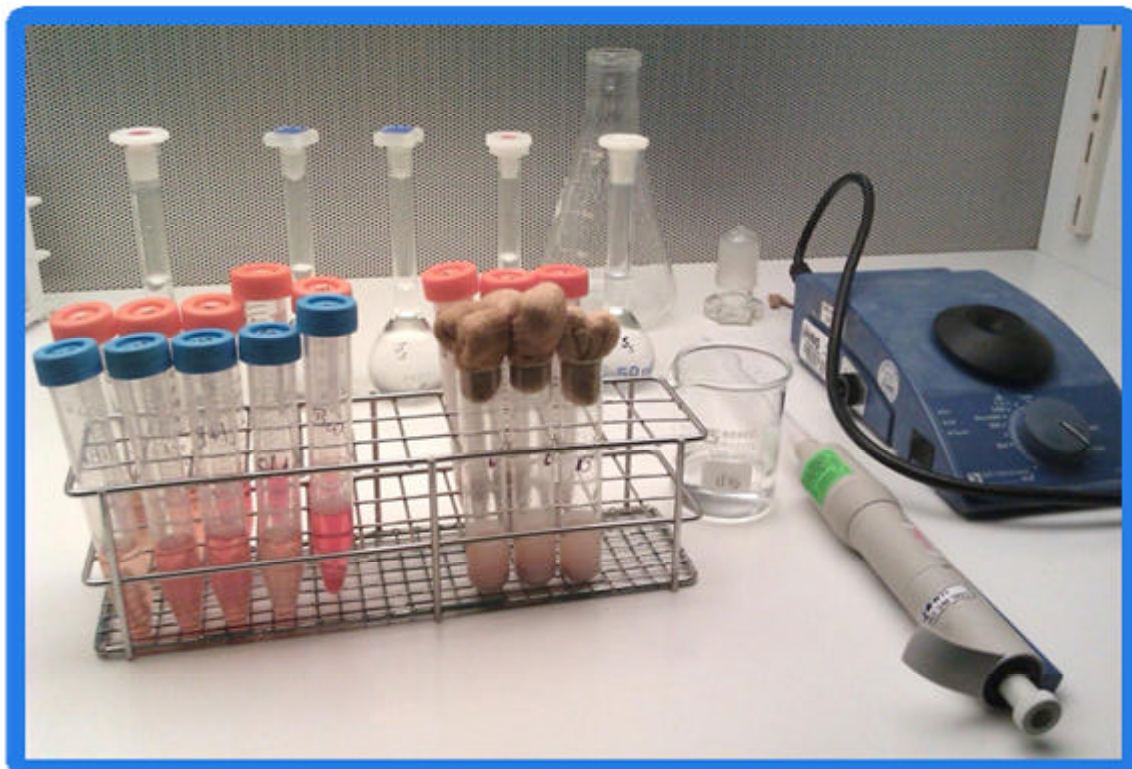
ANEXO N° 14. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS



Muestras de suero y tejido óseo en polvo



Balanza electrónica para pesado de 1g de tejido óseo en polvo



Preparación de muestras de tejido óseo en polvo, agregando 2ml de solución buffer N° 3 (0,1 mol/L, pH 8,0) a 1 g de hueso en polvo.

ANEXO N° 15. PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR



Cabina de flujo laminar

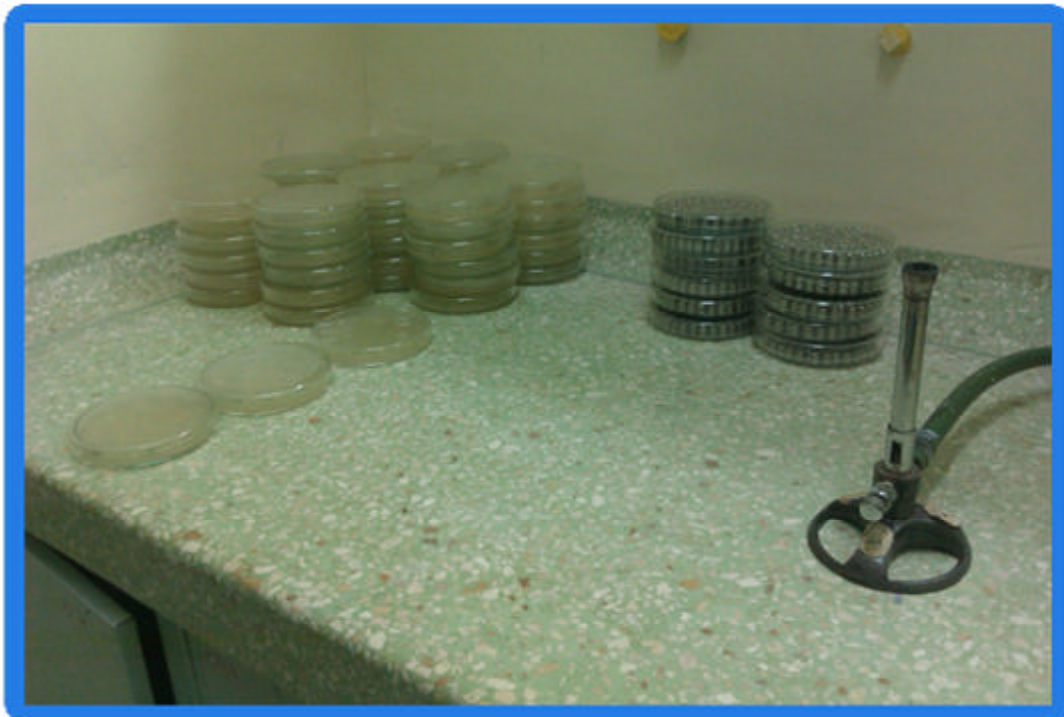


Dilución de Clorhidrato de Clindamicina USP

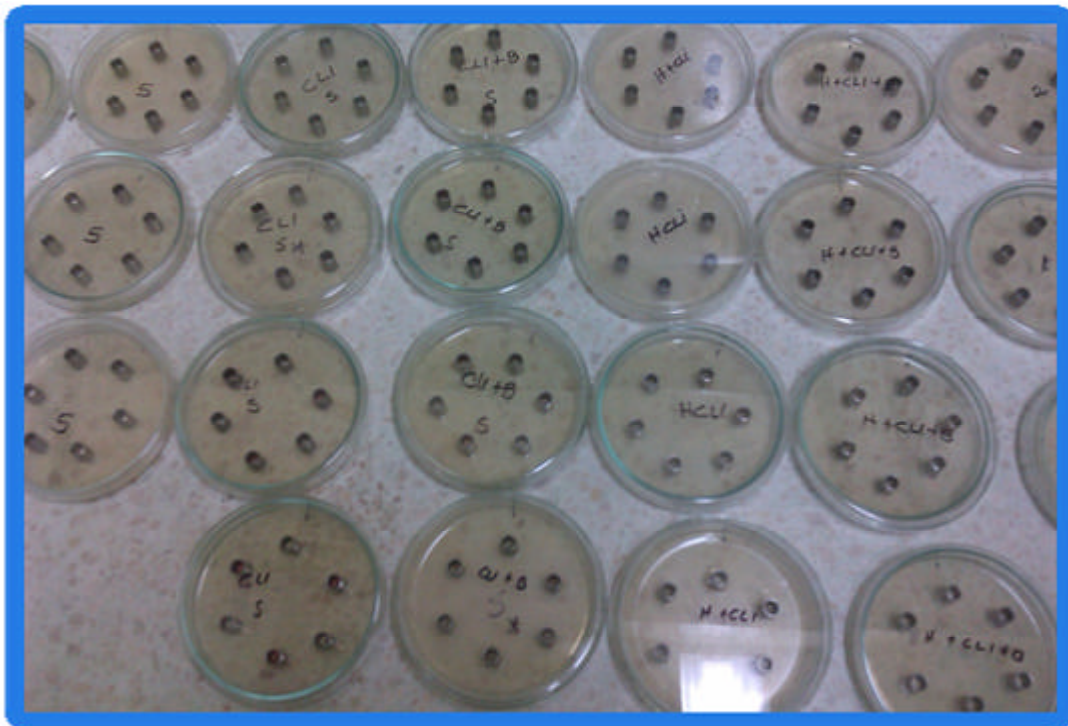


Soluciones estándar

ANEXO N° 16. PREPARACIÓN DE LAS PLACAS

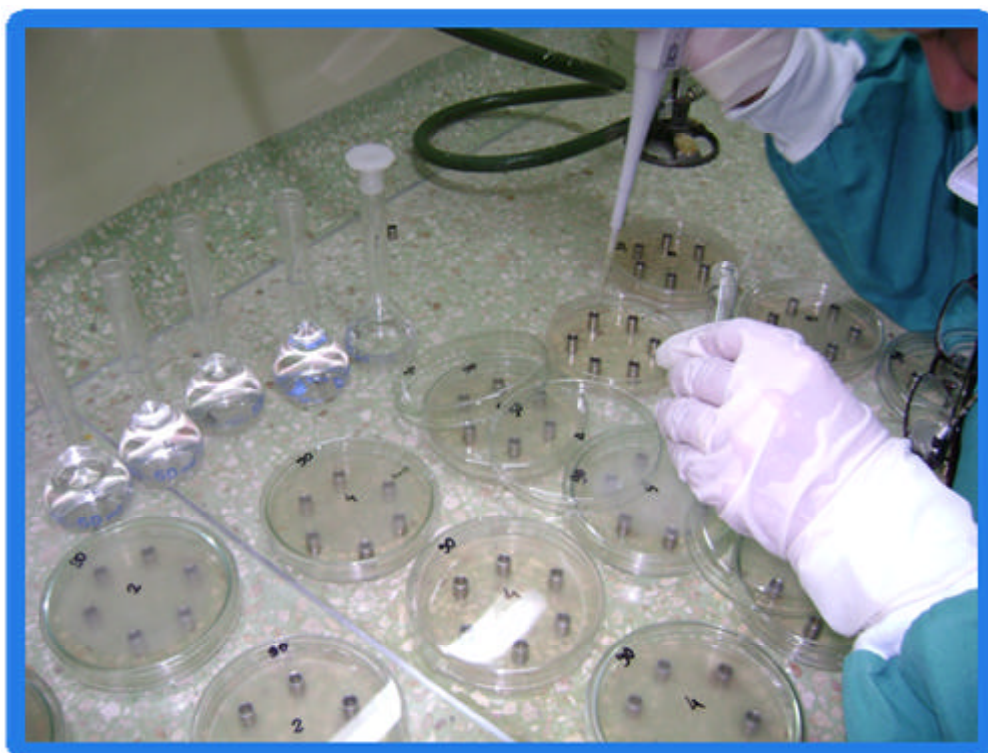


Preparación y rotulado de placas para colocación del medio de cultivo

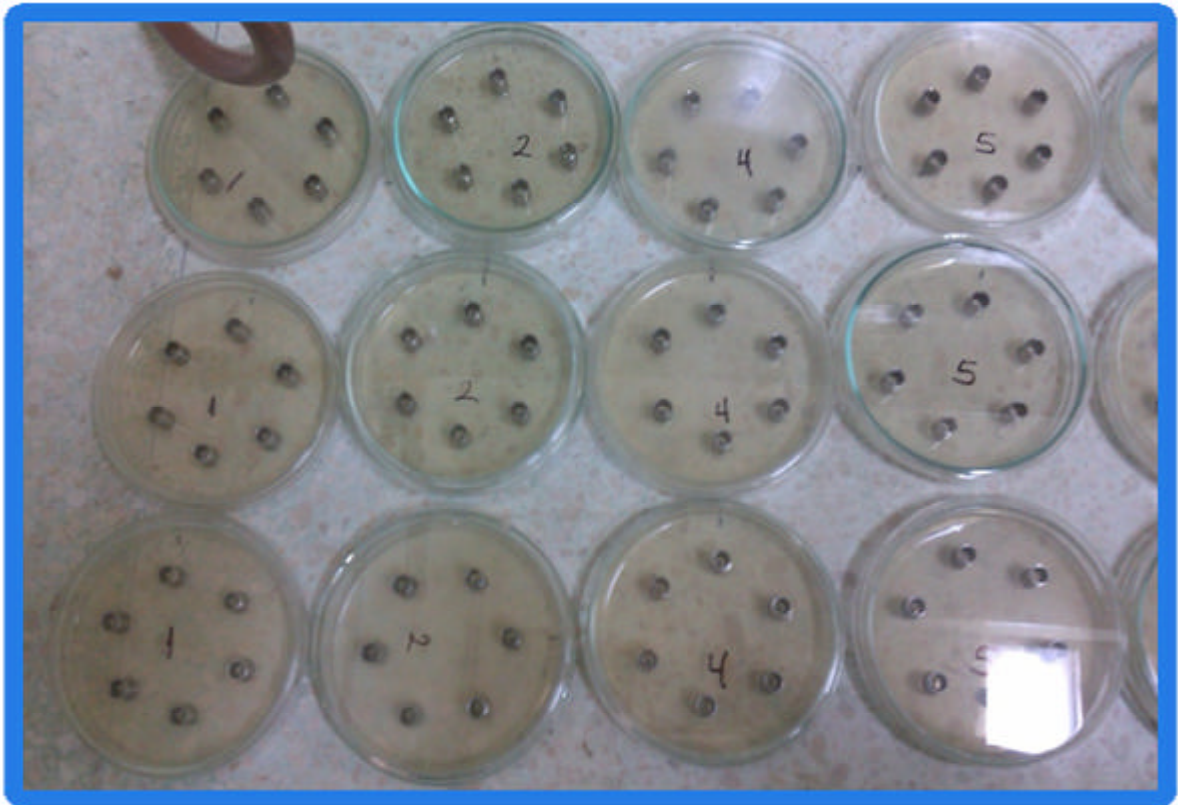


Placas rotuladas con sus respectivos cilindros de metal

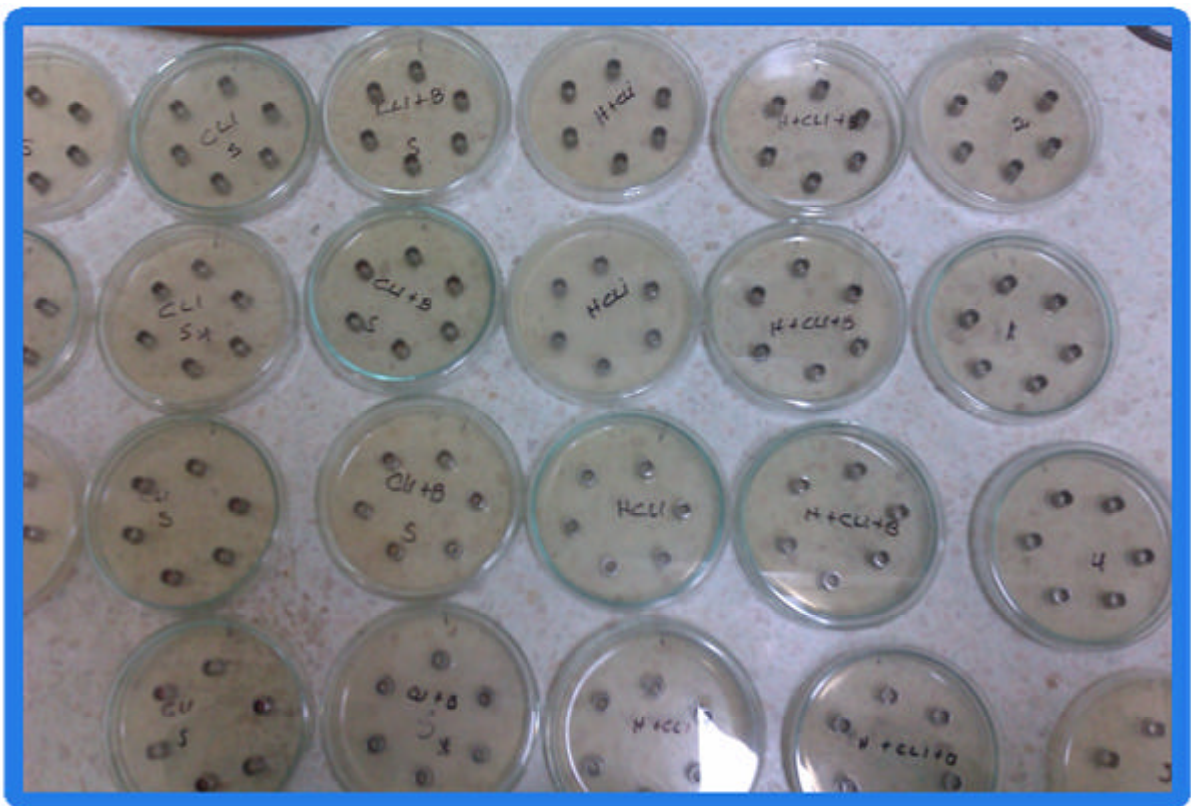
ANEXO N° 17. ENSAYO MICROBIOLÓGICO



Colocación de las soluciones estándar en los cilindros de metal



Placas Petri con las soluciones estándar para curva de calibración



Placas Petri con las muestras de suero y de tejido óseo

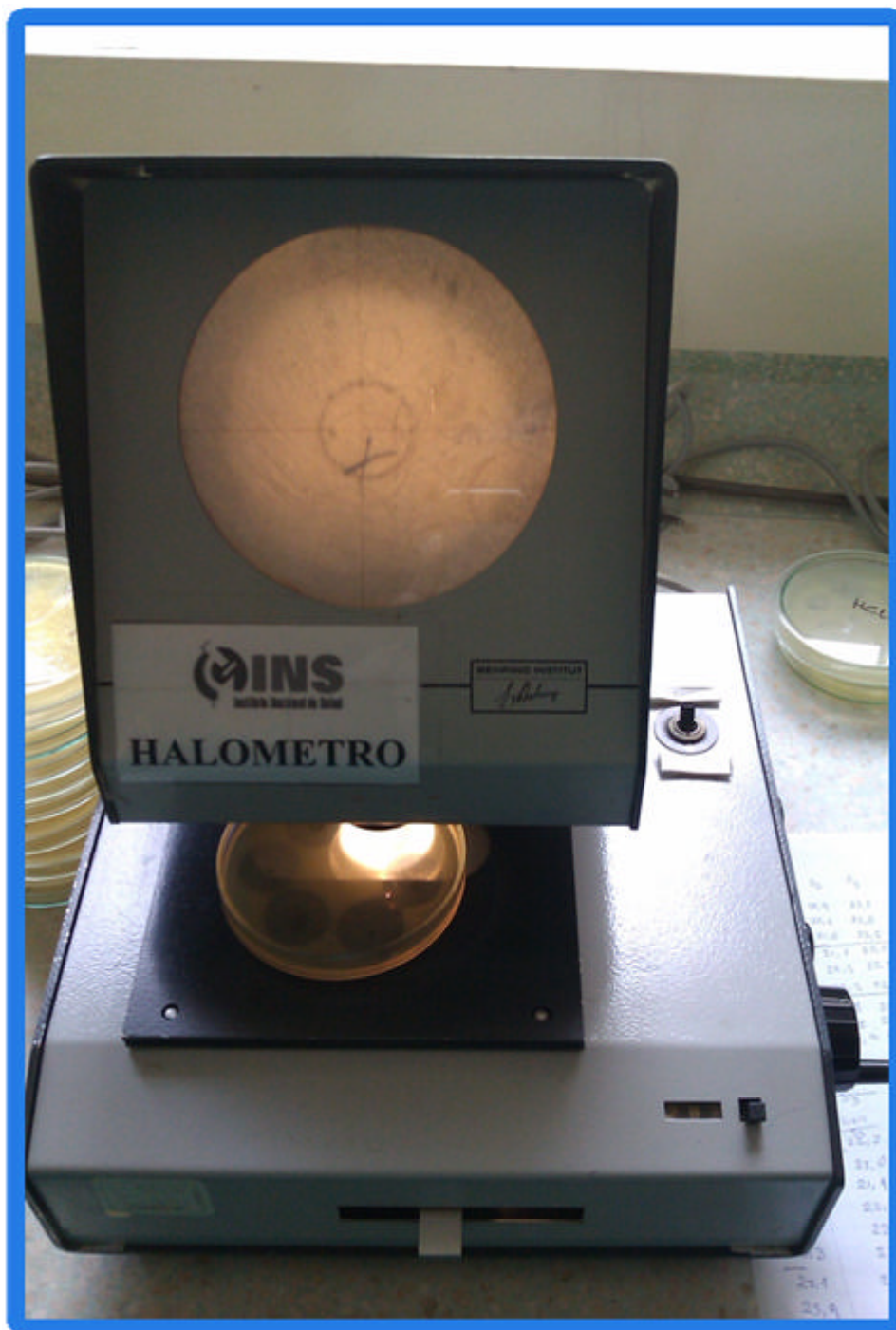


Placas Petri con sus respectivas soluciones



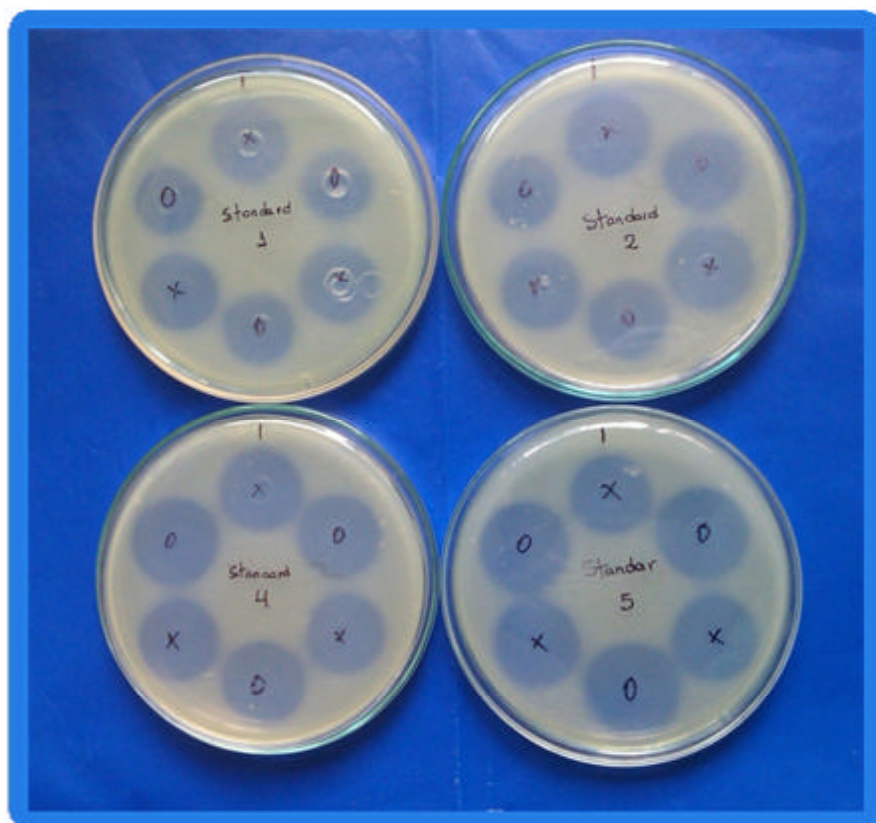
Estufa para incubación de las placas a 32 - 35°C durante 18 horas.

ANEXO N° 18. HALÓMETRO



Medición de los halos de inhibición

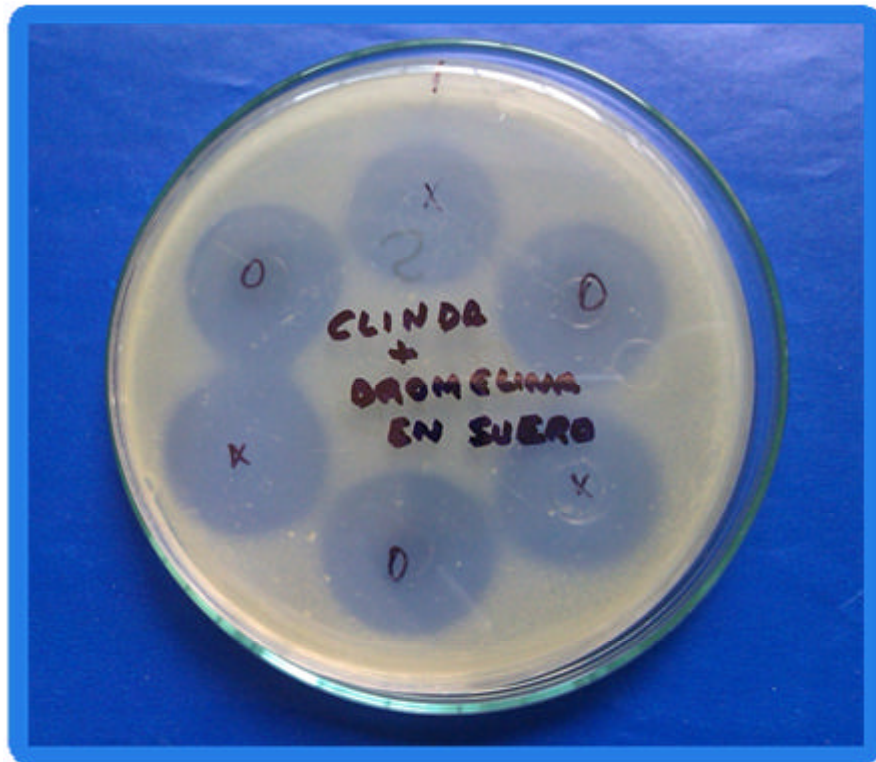
ANEXO N° 19. PLACAS DE SIEMBRA CON HALOS DE INHIBICIÓN



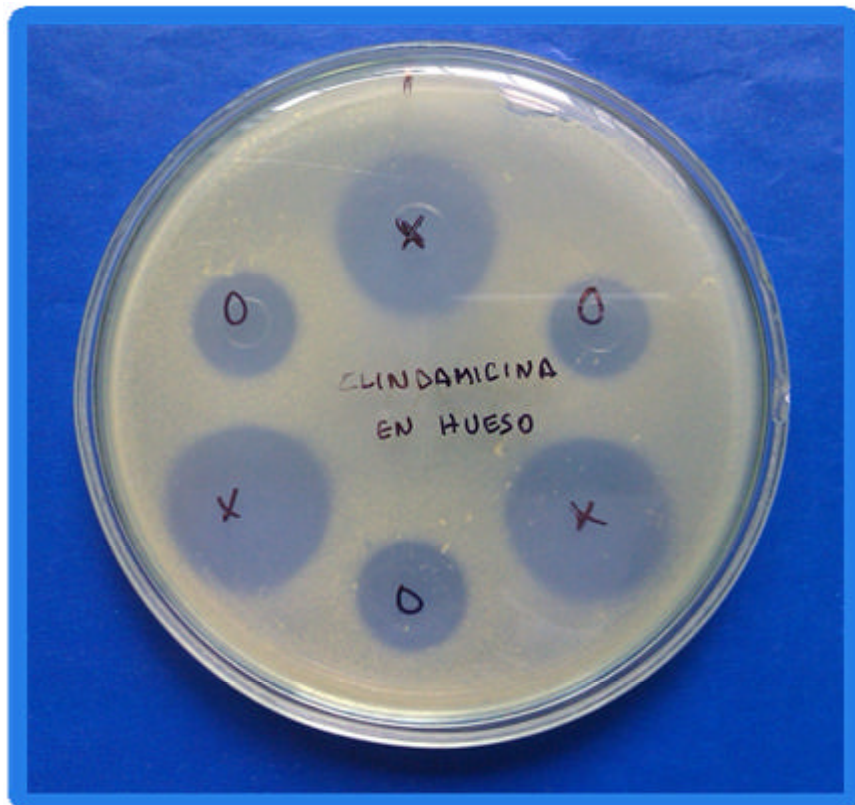
Halos de inhibición en las placas con las soluciones estándar



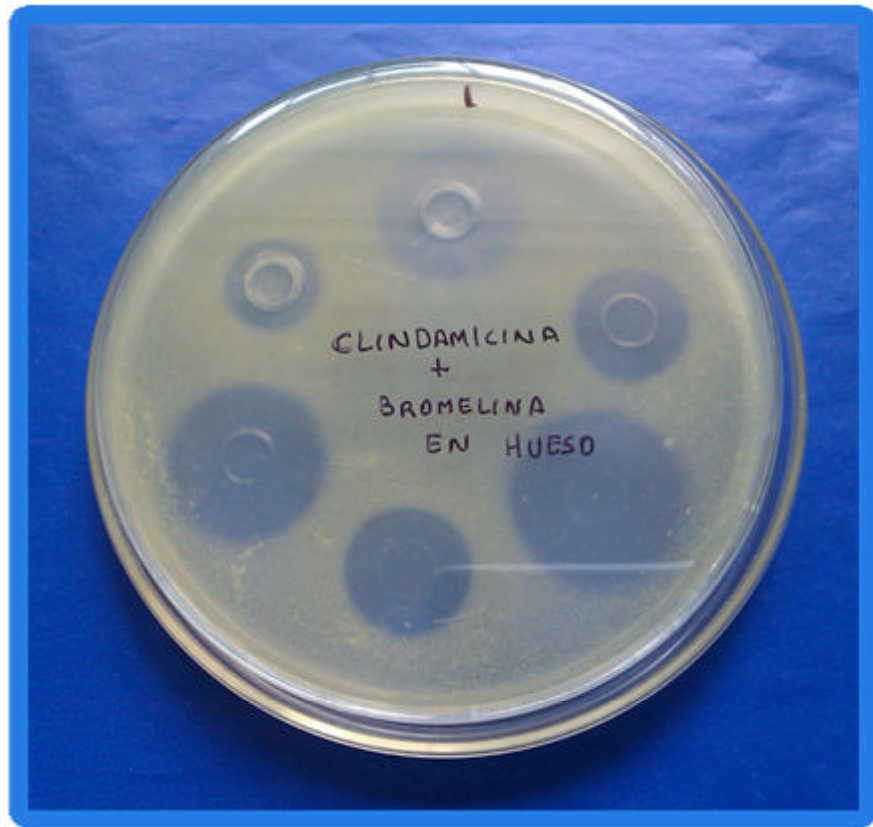
Halos de inhibición de las muestras de suero del grupo A



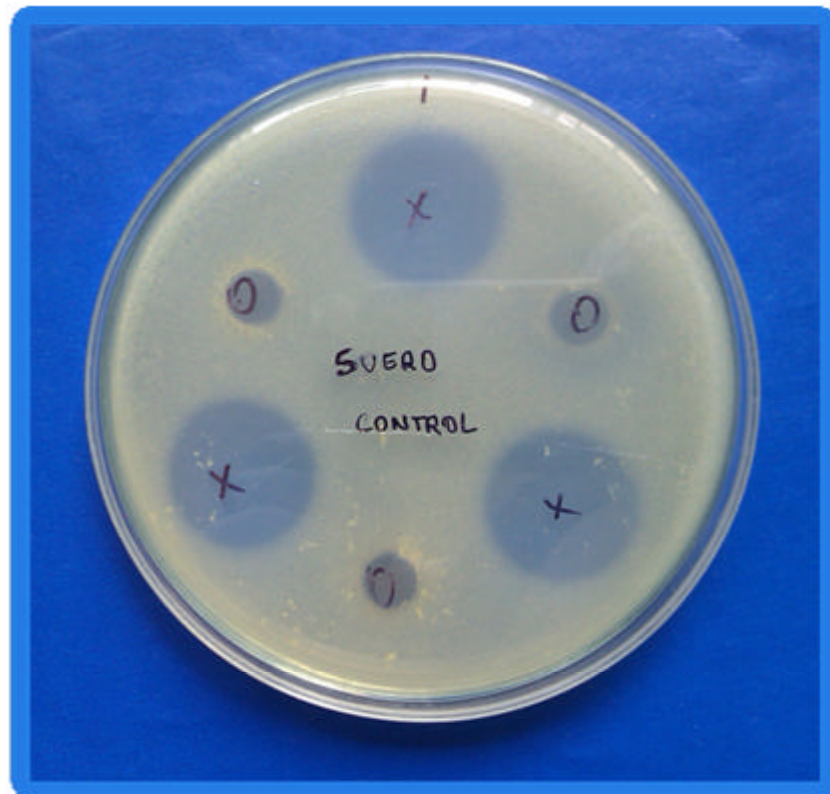
Halos de inhibición de las muestras de suero del grupo B



Halos de inhibición de las muestras óseas del grupo A



Halos de inhibición de las muestras óseas del grupo B



Halos de inhibición de las muestras de suero del grupo Control



Halos de inhibición de las muestras óseas del grupo Control